

Thèse

Présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
délivré par **L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE**

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences de la Matière

SPÉCIALITÉ : Science des Agroressources

par Mlle **Aurélie MOSSION**

Étude de la composition minérale et organique des liqueurs de thé et de leurs caractéristiques organoleptiques : Influence des paramètres physico-chimiques de l'eau

Soutenue le 10 décembre 2007 devant le jury composé de :

M.	Fritz FRIMMEL Professeur – Université de Karlsruhe – Karlsruhe – Allemagne	Rapporteurs
Mme	Laura SIGG Professeur – EAWAG – Dübendorf – Suisse	
M.	Philippe BEHRA* Professeur – LCA – ENSIACET – Toulouse	Membres
Mme	Elisabeth BORREDON Professeur – LCA – ENSIACET – Toulouse	
Mme	Véronique CHEYNIER Directeur de recherche – INRA – UMR Sciences pour l'œnologie - Montpellier	
Mme	Martine POTIN-GAUTIER* Professeur – ECABIE – IPREM – Pau	
Mme	Christine RAYNAUD Ingénieur de recherche – LCA – ENSIACET – Toulouse	
M.	Hervé THIS Ingénieur de recherche – AgroParisTech – Paris	
M.	Philippe COHEN-TANUGI Secrétaire général – Mariage Frères International – Paris	Invité

* Directeurs de thèse

*À ma famille
Qui m'a toujours soutenue
Et encouragée à suivre les chemins
Que je désirais.*

*À Anthony, mon futur mari,
Qui a toujours été présent.*

REMERCIEMENTS

Les travaux de recherche qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés grâce à la collaboration des Laboratoires de Chimie Agro-Industrielle de l'Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques et de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement de l'Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux à Pau. Je remercie Mlle Marie-Elisabeth BORREDON et M. Olivier DONARD, leur directeur, de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Je souhaite également remercier les membres du jury qui ont accepté d'examiner ces travaux de recherche, Mesdames Laura SIGG, Véronique CHEYNIER, Marie-Elisabeth BORREDON, Martine POTIN-GAUTIER et Christine RAYNAUD ainsi que Messieurs Fritz FRIMMEL, Hervé THIS, Philippe COHEN-TANUGI et Philippe BEHRA. Je remercie tout particulièrement Madame Laura SIGG et Monsieur Fritz FRIMMEL pour leur lecture attentive de mon manuscrit et leurs remarques constructives en tant que rapporteurs.

Je remercie la société Mariage Frères pour le soutien matériel et financier permettant la réalisation de ces travaux.

Ce travail a également été possible grâce à la collaboration avec différents laboratoires, notamment le Laboratoire de Génie Chimique pour la réalisation des mesures de potentiel zêta. Je remercie à ce titre M. Patrice BACCHIN pour la formation sur l'appareil. Je remercie également Mesdames Myriam MALET-MARTINO et Véronique GILARD du Laboratoire de Synthèse et Physicochimie de Molécules d'Intérêt Biologique pour l'analyse des liqueurs de thé par RMN et pour les discussions constructives que nous avons eu sur le sujet.

Christine, merci de votre implication dans le projet et de m'avoir fait découvrir l'importance que pouvait avoir l'analyse sensorielle dans le monde de la recherche.

Ce travail n'aurait pas été le même sans l'encadrement de Martine et Philippe. Je tiens à vous exprimer ici ma plus profonde gratitude pour votre aide au cours de ces trois années. Malgré vos emplois du temps surchargés, vous avez toujours trouvé du temps pour discuter, réfléchir et m'aider à avancer. Merci tout particulièrement pour votre soutien scientifique mais aussi humain dans la dernière ligne droite de la rédaction qui a été particulièrement difficile.

Mais que seraient ces trois années sans l'aide des p'tites mains de laboratoire... Que ce soit à Pau ou à Toulouse, j'ai rencontré de nombreuses personnes qui m'ont aidée, conseillée et supportée. Je souhaite ici les en remercier.

À Pau, un grand merci tout particulier à Maïté et Fabienne pour leur aide dans la gestion des plannings de manip mais aussi leur aide précieuse sur place. Merci à Jean, Corinne, Pauline, Isabelle et Biquet le MacGyver du labo (on l'a eu ce COT-mètre...).

À Toulouse, merci à tous les « panélistes » qui ont supporté les dégustations de solutions astringentes et de liqueurs de thé. Sans vous, cette thèse ne serait pas la même : Anne, Antoine, Cathy, Dana, Jérôme, Karine, Laure, Marie-Christine, Marjorie, Muriel, Pascale, Philippe, Pierre-Yves, Sophie, Virginie (mention spéciale pour toi qui n'aime pas le thé !) et Valérie Reynaud.

Merci aux différents stagiaires qui m'ont aidé dans ce travail et que j'ai suivi de près ou de loin : Alice, Marie-Pierre, Sébastien mais aussi Christian et Gocha : merci particulièrement à vous deux pour votre sérieux et votre engagement dans le projet et aussi à Marie et Damien pour l'analyse sensorielle. Bonne continuation à tous...

Merci aux bureaux des « secrétaires » : Mireille, Isabelle H., Isabelle N., Karine, Marie-Christine et de la « logistique » : Emmanuelle, Didier et Michel pour votre grande disponibilité et votre bonne humeur...

Ces trois années ont été faites de nombreuses rencontres qui resteront un excellent souvenir : Merci tout particulier à Anne, Brigitte et Géraldine pour les discussions le midi autour de notre gamelle...

Merci à mes collègues de galère en chromatographie : Laure, Jérôme et Philippe pour les pannes techniques, Virginie et Marjorie (nos premiers pas furent difficiles mais on a réussi à dompter la bête...), Céline M. (vive l'HPIC !!) et Didier le MacGyver de Toulouse...

Merci à Stéphane, notre rencontre a été tardive mais les journées de manip RMN ont été des bouffées d'oxygène en cette fin de thèse...

Merci à Antoine, Caro, Jérôme, Florina et Lupita, mes compagnons de course...un petit footing et ça repart...

Merci aux collègues du sous-sol pour la bonne ambiance et le soutien mutuel... la proximité a au moins un avantage...

Marjorie et Céline, merci de votre soutien sans faille dans les moments difficiles... La thèse a fait de nous des amies ; nos routes « professionnelles » se sont séparées mais on garde le contact !!

Merci à Amandine et Antoine pour toutes ses longues soirées passées à discuter du présent, de l'avenir et de la vie en générale...

Merci à tous mes amis d'ici ou d'ailleurs pour nos discussions, nos soirées : Estelle, Benoît, Suzanne, Yann, Mélanie, Aude, Yoann, Steph, Nico, Michael, Isabelle, Gaëtan, Antoine R., Laure, Claire, Béné et tous les autres...

Merci à mes proches notamment mes parents, ma sœur et sa p'tite famille, cette thèse a commencé avec la naissance d'Adrien et s'est finie avec celle d'Anaïs... Deux belles bouffées d'oxygène pour une tatie gâteau ou gatteuse !!! Sans vous, rien n'aurait été possible, merci de votre soutien et de votre amour...

Enfin, que te dire, Anthony, toi, qui a toujours été là pour m'écouter, me reconforter et m'encourager dans les moments de doute... Tous les mots ne suffiraient pas alors MERCI !!

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

NOTATION ET ABRÉVIATIONS

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE 1. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1.1. PRÉSENTATION DE <i>CAMELLIA SINENSIS</i>	5
1.1.1. <i>Historique</i>	5
1.1.2. <i>La culture du thé</i>	7
1.1.3. <i>Les procédés de traitement des feuilles de thé fraîchement cueillies</i>	9
1.2. COMPOSITION DES FEUILLES DE THÉ	12
1.2.1. <i>La paroi cellulaire</i>	12
1.2.2. <i>Les autres composés organiques</i>	15
1.2.3. <i>Les composés minéraux</i>	24
1.3. DES FEUILLES À LA LIQUEUR DE THÉ	25
1.3.1. <i>Préparation des liqueurs</i>	25
1.3.2. <i>Les composés organiques</i>	26
1.3.3. <i>Les composés minéraux</i>	34
1.3.4. <i>Analyse sensorielle</i>	40
1.3.5. <i>Importance de l'eau utilisée pour les liqueurs</i>	43
CHAPITRE 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	47
2.1. MATÉRIEL	47
2.1.1. <i>Thés</i>	47
2.1.2. <i>Eaux</i>	48
2.1.3. <i>Réactifs</i>	48
2.2. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	50
2.2.1. <i>Préparation des liqueurs de thé</i>	50
2.2.1. <i>Filtration et ultrafiltration</i>	51
2.2.2. <i>Minéralisation</i>	52
2.3. MÉTHODES D'ANALYSES	52
2.3.1. <i>Caractérisation des feuilles de thé</i>	52
2.3.2. <i>Caractérisation des échantillons</i>	56

CHAPITRE 3. COMPOSITION DES FEUILLES ET DES LIQUEURS DE THÉ	75
3.1. LES FEUILLES DE THÉ	75
3.1.1. <i>Effet du traitement</i>	75
3.1.2. <i>Composition des feuilles de thé</i>	79
3.2. LES LIQUEURS DE THÉ	82
3.2.1. <i>Caractérisation des eaux</i>	82
3.2.2. <i>Préparation des liqueurs de thé</i>	87
3.2.3. <i>Influence de la nature du thé sur les propriétés physico-chimiques des liqueurs de thé</i>	90
3.2.4. <i>Influence de la nature de l'eau : Eaux minérales naturelles</i>	93
3.2.5. <i>Influence de la nature de l'eau : Eaux synthétiques</i>	103
CHAPITRE 4. QUALITÉS ORGANOLEPTIQUES DES LIQUEURS DE THÉ	125
4.1. PROFIL SENSORIEL DE QUATRE THÉS	125
4.1.1. <i>Génération et sélection des descripteurs</i>	125
4.1.2. <i>Entraînement des juges</i>	129
4.1.3. <i>Analyse Descriptive Quantitative</i>	136
4.2. ÉVALUATION SENSORIELLE DES LIQUEURS D'UN THÉ NOIR	144
CHAPITRE 5. DISCUSSION	151
5.1. MODIFICATION DE LA COULEUR	151
5.2. MODIFICATION DE L'ASTRINGENCE	153
5.3. EXTRACTION DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX	154
5.4. MODIFICATION DE L'AMERTUME	158
5.5. SYNTHÈSE DES MÉCANISMES MIS EN JEU	160
CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES	163
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	165
LISTE DES FIGURES	173
LISTE DES TABLEAUX	177
ANNEXE	181

NOTATION ET ABRÉVIATIONS

Composés:

AG :	acide gallique
C :	catéchine
CAF :	caféine
CI :	carbone inorganique
COD :	carbone organique dissous
COT :	carbone organique total
CT :	carbone total
EC :	épicatéchine
ECG :	épicatéchine gallate
EGC :	épigallocatechine
EGCG :	épigallocatechine gallate
FOP :	<i>Flowery Orange Pekoe</i>
MO:	matière organique
TB :	théobromine
TF :	théaflavines
TN :	thé noir
TO :	thé Oolong
TP :	théophylline
TPC:	polyphénols totaux (<i>Total polyphenols content</i>)
TR :	théarubigines
TV :	thé vert
UP :	eau ultra pure

Méthodes analytiques :

HPLC :	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (chromatographie liquide haute performance)
ICP-AES :	<i>Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy</i> (spectrométrie d'émission atomique à plasma induit)
MEB :	Microscopie électronique à balayage
MS :	<i>Mass Spectrometry</i> (spectrométrie de masse)
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
UV :	Ultra Violet

Paramètres, grandeurs :

c_{∞} :	concentration d'un composé à l'équilibre
c :	concentration d'un composé au temps t
Da :	Daltons
DA :	degré d'acétylation
DM :	degré de méthylation
H_r :	humidité relative
k_{obs} :	constante cinétique (s^{-1})
K_a :	constante d'association entre la caféine et la théaflavine pour la réaction $T + C \leftrightarrow TC$
K_b :	constante d'association entre la caféine et la théaflavine pour la réaction $TC + C \leftrightarrow TC_2$
t :	temps écoulé depuis le début d'une infusion

Divers :

ACP :	Analyse en Composantes Principales
ANC :	capacité à neutraliser des acides ou alcalinité
ANOVA :	<i>ANalysis Of Variance</i> (analyse de variance)
CTC :	Crush Tear Curl (Broyer – Déchiqueter – Enrouler)
HR :	Humidité Relative

Organismes :

FAO :	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organisation des Nations-unies pour l'alimentation et l'agriculture)
GEMS :	<i>Global Environment Monitoring System</i> (système de surveillance des eaux des Nations-unies)
LCABIE :	Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les infusions ou liqueurs de thé représentent la boisson préparée à partir des feuilles du théier, *Camellia sinensis*. L'histoire de cette boisson remonterait, selon la légende chinoise, à 3 000 ans avant Jésus-Christ. Par contre, elle n'est apparue en Europe qu'au XVII^{ème} siècle par la voie maritime mise en place par les Hollandais. Depuis, sa consommation n'a cessé d'augmenter pour devenir, de nos jours, la seconde boisson la plus consommée au monde après l'eau plate. Le marché du thé est un marché singulier étant donné que les principaux pays producteurs, la Chine et l'Inde, sont également les principaux consommateurs. Le premier pays exportateur est le Kenya avec seulement 9 % de la production mondiale.

Après leur récolte, les feuilles du théier, appelées par abus de langage « feuilles de thé », sont commercialisées en trois grandes familles : les thés noirs, les thés verts et les thés *Oolong*. Tous proviennent des feuilles de *Camellia sinensis*, de variété *sinensis* ou *assamica*, mais diffèrent par le procédé de manufacture. Le thé vert est le thé le plus consommé en Chine, les feuilles sont simplement roulées et séchées après la cueillette. En Europe, même si la consommation de thés verts est en forte augmentation suite aux nombreuses publications reprises dans les médias vantant leurs propriétés bénéfiques pour la santé, le thé noir est encore le plus apprécié. Il est obtenu après une phase d'oxydation totale des polyphénols présents dans les feuilles par les enzymes polyphénoloxydases. Pour le thé *Oolong*, troisième type de thé, la phase d'oxydation n'est que partielle. Les feuilles de thé contiennent majoritairement des polyphénols de la sous-classe des flavan-3-ols, des alcaloïdes et des éléments minéraux.

Les méthodes de préparation des infusions ou « écoles du thé » ont évolué au cours du temps. Les trois préparations prédominantes, correspondant à trois dynasties chinoises, sont le thé bouilli, le thé battu et le thé infusé. La méthode par infusion est majoritaire en Europe car elle correspond à la période où le thé y a été introduit. Dans ce cas, différents paramètres sont connus pour modifier la composition des liqueurs obtenues. Les principaux sont la température de l'eau, le rapport masse de feuilles sur masse d'eau et la durée d'infusion. De même, il semblerait que la présence de minéraux, notamment le calcium, influence la composition des liqueurs au niveau des théaflavines et de la caféine. Peu de travaux ont été

consacrés à l'effet de l'eau sur l'extraction des éléments minéraux et sur les conséquences au niveau des qualités organoleptiques

Le but de cette étude est donc de mieux comprendre l'influence des paramètres physico-chimiques de l'eau sur l'extraction des composés organiques et minéraux, leur complexation et la conséquence au niveau des qualités organoleptiques des infusions ainsi obtenues.

Dans le premier chapitre de ce travail est présenté *Camellia sinensis*, son milieu de culture, les différents procédés de manufacture subis par les feuilles et leur composition puis l'ensemble des propriétés des liqueurs obtenues par infusion des feuilles.

Le deuxième chapitre décrit l'ensemble du matériel et des méthodes analytiques utilisées dans ce travail pour caractériser les liqueurs de thé aussi bien au niveau de leur composition organique et minérale que de leurs propriétés organoleptiques.

Au cours du troisième chapitre, sont présentés les résultats relatifs à l'étude de l'influence de différents paramètres que sont la nature des feuilles et la composition physico-chimique des eaux sur la composition organique et minérale des liqueurs de thé obtenues.

Le quatrième chapitre traite des résultats obtenus lors de l'analyse sensorielle des liqueurs et de leurs caractérisations en fonctions de différents thés et de différentes eaux.

Dans le cinquième chapitre, la corrélation entre les données sensorielles et physico-chimiques caractérisant les liqueurs de thé permet de mieux comprendre les mécanismes lors de l'extraction puis lors de la complexation au sein des infusions.

CHAPITRE 1

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. PRÉSENTATION DE CAMELLIA SINENSIS	5
1.1.1. Historique	5
1.1.2. La culture du thé	7
1.1.2.1. Le théier	7
1.1.2.2. Le milieu de culture	8
1.1.2.3. Le cycle végétal	8
1.1.3. Les procédés de traitement des feuilles de thé fraîchement cueillies	9
1.2. COMPOSITION DES FEUILLES DE THÉ	12
1.2.1. La paroi cellulaire	12
1.2.1.1. Les celluloses	12
1.2.1.2. Les hémicelluloses	13
1.2.1.3. Les substances pectiques	13
1.2.2. Les autres composés organiques	15
1.2.2.1. Les polyphénols	15
1.2.2.1.1. Les flavan-3-ols du thé	17
1.2.2.1.2. Les composés issus de l'oxydation des flavan-3-ols	18
1.2.2.1.3. Les alcaloïdes	21
1.2.2.2. Les composés volatils et les anions organiques	22
1.2.2.3. Technique d'analyse	22
1.2.3. Les composés minéraux	24
1.3. DES FEUILLES À LA LIQUEUR DE THÉ	25
1.3.1. Préparation des liqueurs	25
1.3.2. Les composés organiques	26
1.3.2.1. Facteurs influençant l'extraction des composés organiques	26
1.3.2.2. Complexation des molécules organiques	28
1.3.2.2.1. La crème de thé	29
1.3.2.2.2. L'écume de thé	33
1.3.3. Les composés minéraux	34
1.3.3.1. Composition des liqueurs	34
1.3.3.2. Fractionnement et spéciation	34
1.3.3.2.1. L'aluminium	35
1.3.3.2.2. Le fer	37
1.3.3.2.3. Le manganèse	39
1.3.3.2.4. Les autres éléments	39
1.3.4. Analyse sensorielle	40
1.3.4.1. Les méthodes d'évaluation sensorielle	40
1.3.4.2. Le traitement des données	41
1.3.4.3. Évaluation sensorielle du thé	42
1.3.5. Importance de l'eau utilisée pour les liqueurs	43

Chapitre 1. Étude Bibliographique

1.1. Présentation de *Camellia sinensis*

1.1.1. Historique

L'histoire du thé, boisson obtenue par infusion des feuilles du *Camellia sinensis*, littéralement « Camellia Chinois », remonterait au III^{ème} millénaire avant J.C. selon la légende chinoise. Cependant, les premiers écrits faisant référence de manière indiscutable au thé datent de la dynastie des Han (206 avant J.C. – 220 après J.C.). De plus, à cette époque, l'usage du thé est confiné à la province actuelle du Sichan dans le sud-ouest de la Chine. Le thé se répand dans le pays parallèlement au bouddhisme avant de s'ancrer dans la culture du pays durant la dynastie Tang (618-907) grâce au célèbre *Cha King* ou « Classique du thé » du Maître Lu Yu. Durant cette dynastie, apparaît le caractère *cha* encore utilisé de nos jours pour désigner le thé. Ce sinogramme possède deux prononciations différentes : « ch'a » en mandarin et cantonais, qui vient du verbe « cueillir », et « t'e » en dialecte chinois Minnan pratiqué dans la région d'Amoy (actuelle Xiamen), au sud-est de la Chine. Ces deux prononciations sont à l'origine des différences observées dans l'appellation du thé au travers le monde. Le thé a voyagé soit par la voie de la soie terrestre soit par la voie maritime. Les pays ayant découvert le thé par la voie terrestre, comme l'Afghanistan, le Tibet et le Japon par exemple, se servent du « tch » ou « ch » provenant du mot cantonais. Les pays d'Europe n'ont, eux, connu le thé que bien plus tard par la voie maritime mise en place par les Hollandais (XVII^{ème} siècle), voie qui partait de la région d'Amoy. Dans ces pays, le thé est désigné par un mot commençant par « t » : *tea*, *tee*, thé. Ainsi le thé n'apparaît en Europe qu'au cours du XVII^{ème} siècle, d'abord en Hollande puis en France et enfin en Angleterre (Mariage Frères, 2003).

A cette époque, les émigrants anglais et hollandais emportent également avec eux le thé vers le nouveau monde. L'enjeu économique est tel qu'il donne alors lieu à des courses de vitesse entre les *tea-clippers*, voiliers légers utilisés pour le transport du thé sur les grandes routes maritimes entre l'Europe et l'Amérique. En 1773, les colons installés à Boston décident de boycotter ces importations trop lourdement taxées et le 16 décembre, jettent à la mer une cargaison de thé venant d'Angleterre ; cet acte, appelé « *Boston tea party* », marque la première étape de la guerre d'indépendance.

Au milieu du XIX^{ème} siècle, pour faire face à une demande occidentale croissante, les Anglais développent des plantations en Inde puis dans l'île de Ceylan (Sri Lanka). A la fin du XIX^{ème}

siècle, le thé est implanté dans de nombreux pays d'Asie, dans les pays d'Afrique Noire anglophones tel que le Kenya puis en Amérique du Sud (Figure 1.1).

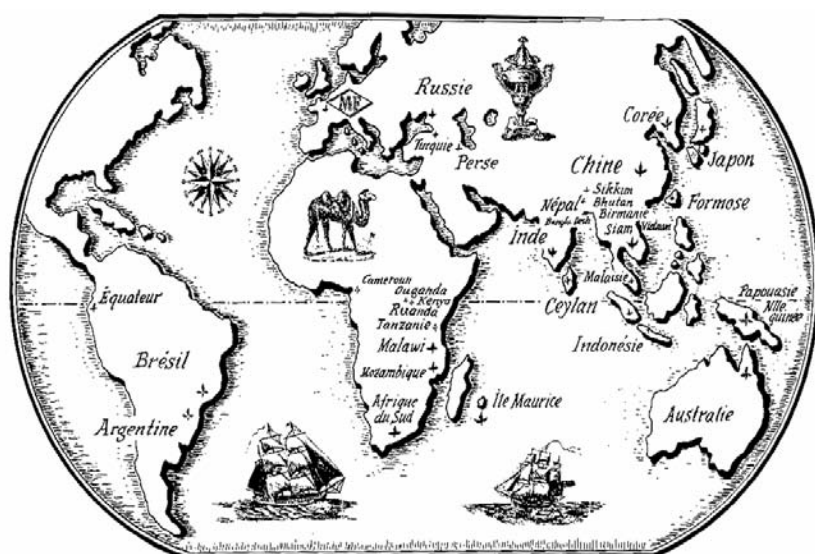


Figure 1.1 : Répartition des plantations de thé dans le monde (Mariage Frères, 1992)

Actuellement, le thé est la boisson la plus consommée dans le monde après l'eau plate. La production mondiale a atteint 3 459 000 tonnes en 2005 (FAO, 2007), répartie principalement entre la Chine et l'Inde (Figure 1.2). Ces deux pays sont aussi les premiers pays consommateurs ce qui rend le marché du thé assez singulier. En effet, le plus grand pays exportateur est le Kenya, 3^{ème} pays producteur avec seulement 9 % de la production mondiale. Par ailleurs, les pays producteurs consomment en moyenne moins de thé par an et par habitant que les pays importateurs. À titre d'exemple, un habitant russe consomme 1,26 kg de thé, un britannique 2,20 kg contre 0,52 kg en Chine, 0,65 kg en Inde et 0,40 kg au Kenya (FAO, 2006; National Bureau of Statistics of China, 2006). En France, la consommation moyenne n'est que de 0,250 kg par an et par habitant mais est en constante augmentation depuis une dizaine d'années.

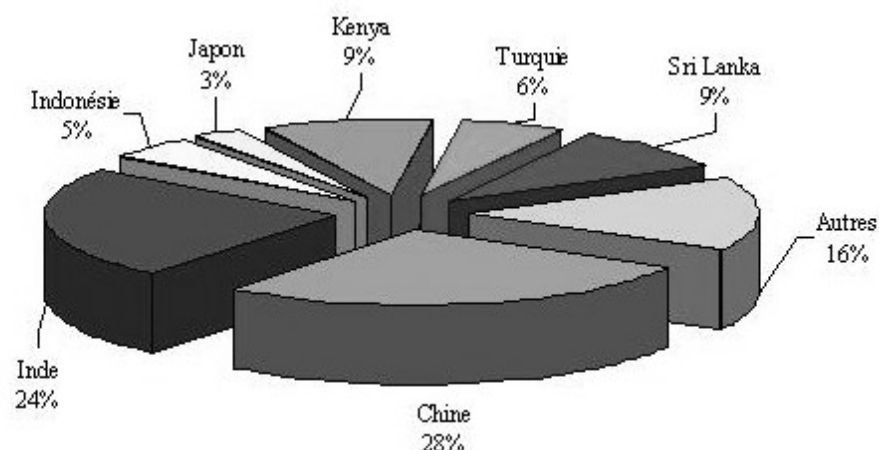


Figure 1.2 : Répartition de la production mondiale en 2005 (FAO, 2007)

Malgré une consommation moyenne par an et par habitant plus faible et étant donné le nombre d'habitants, l'Inde est restée, en 2005, le plus grand consommateur de thé au monde avec 22 % de la consommation mondiale, devant la Chine (20 %), la Russie (5 %), le Japon (4,5 %), le Pakistan et le Royaume-Uni (3,8 %) et les États-Unis (3 %) (FAO, 2006). La consommation mondiale a augmenté en moyenne de 2,25 % par an durant la dernière décennie. Ceci est en partie dû aux nombreuses études vantant les bienfaits du thé pour la santé.

Ainsi, l'empereur Chen-Nung disait « Le thé éveille les humeurs et les pensées sages. Il rafraîchit le corps et apaise l'esprit. Si vous vous sentez abattus, le thé vous rendra force. » (Mariage Frères, 1992). D'après les études récentes, le thé semble réduire le taux de cholestérol, soigner les problèmes d'hypertension, empêcher la formation de caries dentaires, posséder des propriétés anti-oxydantes et anti-microbiennes et protéger contre les maladies cardio-vasculaires et les cancers (Huang *et al.*, 1992; Trevisanato & Kim, 2000; Zuo *et al.*, 2002).

1.1.2. La culture du thé

1.1.2.1. Le théier

Le théier ou *Camellia (L.) O. Kuntze* (espèce) appartient au genre *Camellia L.* de la famille des *theaceae* de l'ordre des *Theales* (United States Department of Agriculture, 2007). Il existe deux variétés principales, la variété *sinensis* (de Chine) utilisée plus particulièrement pour la production de thés verts avec des feuilles petites et vert olive et la variété *assamica* (d'Assam) utilisée pour les thés noirs à la pousse large, claire et charnue. Le théier est un arbre à feuilles

persistantes pouvant atteindre 10 à 15 m voire 30 m pour des arbres plusieurs fois centenaires. Dans les plantations appelées « *gardens* » (jardins) ou « *estates* » (propriétés), les arbres sont taillés à environ 1 m du sol pour former la « table de cueillette » qui facilite la récolte manuelle et favorise la croissance des bourgeons (Delmas & Minet, 2007). Grâce aux différentes méthodes d'hybridation comme le greffage ou le bouturage, de nombreux croisements, appelés « *jats* » ou « *clonal* » sont apparus.

1.1.2.2. *Le milieu de culture*

Le théier croît entre le 42^{ème} degré de latitude nord dans l'hémisphère nord et le 31^{ème} degré de latitude sud dans l'hémisphère sud. Le sol des plantations a une influence sur la qualité des feuilles. Il ne doit être ni calcaire ni argileux mais de préférence alluvionnaire ou volcanique (Delmas & Minet, 2007). Le sol doit également être meuble pour permettre à la racine centrale de descendre jusqu'à 6 m de profondeur et plutôt acide (entre pH 3,9 et 7,1). Il doit être en pente car le théier ne supporte pas l'eau stagnante. Le deuxième élément important est le climat qui doit être sans nuage et offrir des nuits fraîches, des vents réguliers et secs. La température doit être comprise entre 10 et 30 °C. Si celle-ci passe en dessous de -5 °C, le théier meurt. Les besoins en eau sont de l'ordre de 2000 à 3000 mm par an et de préférence la nuit. Une hygrométrie de l'air située entre 70 et 90 % et un ensoleillement de 5 h par jour sont recommandés.

La maladie la plus redoutée est une maladie touchant les feuilles : *Exobasidium vexans* (Massee) ou *Blister blight* (« cloque »). Elle est due à un champignon et est caractérisée par l'apparition de taches circulaires. Lorsque ces cloques éclatent des milliers de spores sont dispersés dans l'air, contaminant ainsi les plantes alentours.

1.1.2.3. *Le cycle végétal*

Le *Camellia sinensis* étant un arbre, sa pousse dépend des conditions climatiques. Les périodes de récolte, « *flush* », alternent avec des périodes de dormance (Tableau 1.1). Les périodes de récolte sont divisées en cycles durant entre 4 et 14 jours. Le plus souvent, ces cycles durent 7 jours. Dans certains pays comme l'Inde et l'Indonésie, les récoltes peuvent avoir lieu toute l'année.

Tableau 1.1 : Cycle naturel du théier (Delmas & Minet, 2007)

Janv.	Fév.	Mar.	Avr.	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.
Dormance	Première récolte			Récolte de printemps		Dormance			Récolte d'automne		Dormance

La cueillette s'effectue manuellement ou mécaniquement. Les feuilles récoltées à la main sont pincées entre le pouce et l'index puis envoyées dans une hotte tressée. La qualité du thé ou « *grade* » dépend du type de cueillettes. Elle est définie par ordre décroissant à partir du type de feuilles en partant de l'extrémité de la tige. Ainsi se trouve en premier lieu sur la table de cueillette un bourgeon appelé « *pekoe* » ou « *Flowery Orange Pekeo* », signifiant « duvet blanc ». Il s'agit en réalité d'une feuille non développée. Puis, plus éloignées de l'extrémité de la tige, se trouvent des feuilles de plus en plus mûres qui portent des noms différents (Figure 1.3). Les types de cueillettes dépendent du nombre de feuilles ramassées avec le *Flowery Orange Pekoe*. Ainsi, en règle générale, les cueillettes sont :

- la cueillette impériale : *Pekoe* + 1 feuille
- la cueillette fine : *Pekoe* + 2 feuilles
- la cueillette classique : *Pekoe* + 3 feuilles ou plus.

La dénomination peut varier suivant les régions.

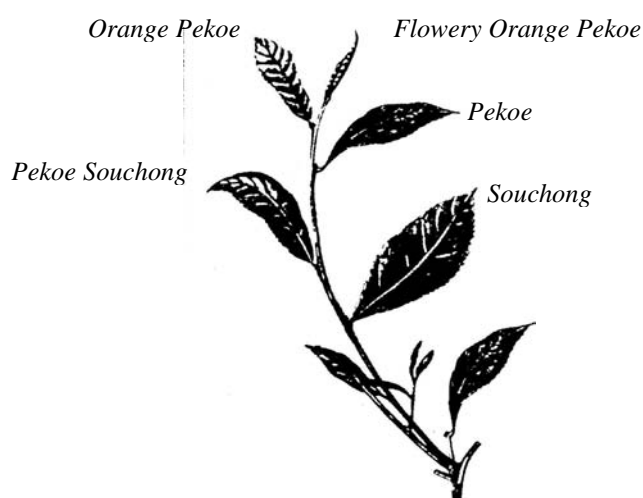


Figure 1.3 : Classification des feuilles de thé (Mariage Frères, 2003)

1.1.3. Les procédés de traitement des feuilles de thé fraîchement cueillies

Les feuilles de thé sont commercialisées sous trois formes principales : les thés verts (25 % de la production mondiale en 2005), noirs (70 % de la production mondiale en 2005) et semi-fermentés ou *Oolong* (5 %). La différence est due aux traitements subis par les feuilles fraîchement cueillies (Figure 1.4).

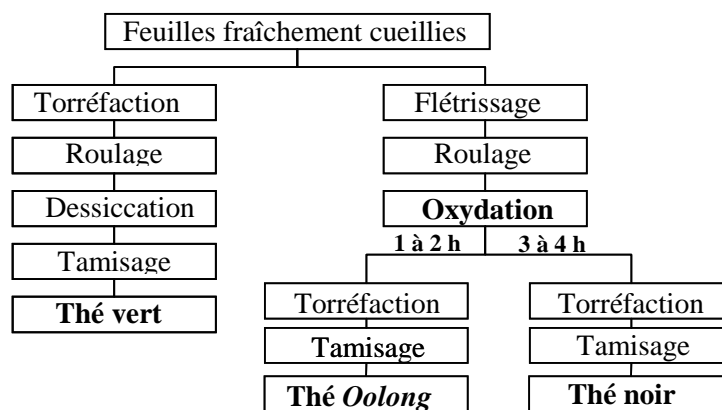


Figure 1.4 : Principales étapes du traitement des feuilles de théier après récolte

La torréfaction consiste à chauffer les feuilles quelques minutes à 100 °C en atmosphère humide pour inhiber les enzymes responsables de l'oxydation. Cette phase dure entre 30 s et 5 min pour les thés verts et *Oolong* et entre 15 et 20 min pour les thés noirs (Delmas & Minet, 2007).

Durant le flétrissage, qui dure entre 16 et 32 h suivant le procédé utilisé, les feuilles sont exposées à de l'air chauffé (< 35 °C) afin de les déshydrater pour les rendre plus souples et permettre de les rouler sans les briser. La teneur en eau des feuilles est réduite de 50 % environ.

Le roulage, dans le cas des thés verts et *Oolong*, a pour but de donner une forme de bâtonnet aux feuilles. Dans le cas des thés noirs, les feuilles sont roulées afin de rompre la paroi cellulaire et permettre la libération des enzymes polyphénoloxydases et peroxydases qui vont oxyder les polyphénols. Ces enzymes sont des complexes métalloprotéiques contenant généralement un site actif formé de deux atomes de cuivre, l'oxygène jouant le rôle d'accepteur d'électrons. Leur activité est optimale pour un pH compris entre 4,6 et 5,6 (Haslam, 2003).

Dans le cas des thés noirs et *Oologs*, après le roulage et avant la fermentation, les feuilles peuvent subir deux procédés différents : le procédé orthodoxe ou le procédé *Crush Tear Curl* (CTC) qui signifie « broyer, déchiqueter, enrrouler ». Avec le procédé orthodoxe, les feuilles sont roulées dans des machines spécialement conçues pour briser les parois cellulaires sans détruire la feuille. Dans le cas du procédé CTC, les feuilles sont écrasées entre deux rouleaux tournant en sens inverse. Ces deux procédés sont les plus couramment utilisés. Les thés noirs en sachet sont obtenus le plus souvent par le procédé CTC alors que les thés en feuilles entières subissent le procédé orthodoxe.

Par la suite, les feuilles subissent l'étape d'oxydation qui est l'étape la plus importante pour

l'obtention des thés noirs et semi-fermentés. Elle est souvent appelée à tort « fermentation ». Les feuilles sont placées dans une atmosphère humide saturée entre 24 et 29 °C. Les feuilles obtenues par le procédé CTC subissent des dommages plus importants au niveau cellulaire et conduisent d'une part à une oxydation plus complète et d'autre part à des morceaux de feuilles de taille plus faible (Goodsall *et al.*, 1999). Les feuilles des thés verts ne subissent pas cette étape d'oxydation et sont immédiatement séchées.

Pour les thés verts, l'étape de dessiccation consiste à sécher les feuilles avec de l'air chaud pendant 2 à 3 min avec alternance de périodes de 30 min de repos pour atteindre 5 à 6 % d'eau. Concernant les thés noirs, la dessiccation consiste à stopper l'oxydation puis à ajuster la teneur en eau des feuilles à une valeur inférieure à 5 %.

Les feuilles sont ensuite tamisées et classées en trois catégories : feuilles entières, brisées ou broyées. L'apparence des feuilles, leur type et le procédé subi déterminent le grade du thé. Ainsi, les appellations diffèrent pour les thés orthodoxes et CTC. Seuls les *grades* orthodoxes sont présentés dans la Figure 1.5 car les autres ne sont que peu utilisés.

En Inde du nord, région de Darjeeling, la description de la cueillette est encore plus précise avec 4 grades supplémentaires :

- *Golden Flowery Orange Pekeo* (GFOP) : FOP dont la proportion de bourgeon est importante ;
- *Tippy Golden Flowery Orange Pekeo* (TGFOP) : FOP contenant beaucoup de bourgeons dorés ;
- *Finest Tippy Golden Flowery Orange Pekeo* (FTGFOP) : FOP de qualité remarquable ;
- *Special Finest Tippy Golden Flowery Orange Pekeo* (SFTGFOP) : FOP de qualité tout à fait extraordinaire, normalement réservé aux meilleurs thés Darjeeling du printemps.

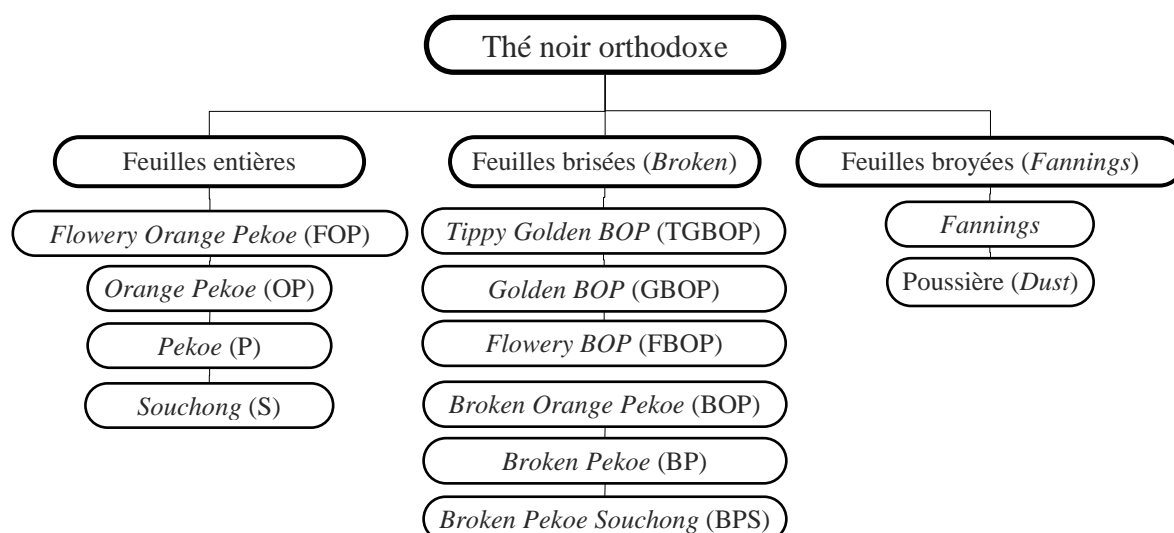


Figure 1.5 : Grades des thés orthodoxes

1.2. Composition des feuilles de thé

Les feuilles de thé fraîches contiennent en règle générale 36 % de composés polyphénoliques, 25 % de glucides, 15 % de protéines, 6,5 % de lignines, 4 % d'acides aminés, 2 % de lipides, 1,5 % d'acides organiques, 0,5 % de chlorophylles et de caroténoïdes et enfin moins de 0,1 % de substances volatiles (Luczaj & Skrzydlewska, 2005) ainsi que des éléments minéraux environ 3 %. Les éléments constitutifs de la paroi cellulaire représentent environ 45 % de la matière sèche des feuilles de thé (Selvendran & Perera, 1971).

1.2.1. La paroi cellulaire

La paroi cellulaire joue un rôle essentiel dans le contrôle des échanges entre l'eau et les feuilles. Les éléments constitutifs de la paroi cellulaire sont majoritairement des polysaccharides (celluloses, hémicelluloses, substances pectiques) ainsi que des protéines constituées d'acides aminés tels que la glycine, la lysine et la thréonine entre autres (Jöbstl *et al.*, 2005).

1.2.1.1. Les celluloses

Les celluloses regroupent un ensemble de polysaccharides de la série des β -D-glucanes. Les maillons D-glucopyranoses sont séparés entre eux par des liaisons glycosidiques de type β (1-4), avec tous les groupements latéraux en position équatoriale. Lors de leurs travaux réalisés

en 1971, Selvendran et Perera (1971) ont trouvé 6,5 % de cellulose dans les feuilles de thé noir analysées.

1.2.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses englobent tous les composés polysaccharidiques autres que la cellulose et les substances pectiques présents dans la paroi cellulaire. Les hémicelluloses sont intimement associées avec la cellulose. Les feuilles de thé contiennent 11,5 % d'hémicelluloses (Selvendran & Perera, 1971).

1.2.1.3. Les substances pectiques

Les pectines, découvertes en 1825 par Braconnot, représentent la troisième catégorie de polysaccharides pariétaux (Braconnot, 1825). Elles tiennent leur nom du grec *Pectos* qui signifie coagulé.

Les pectines sont donc des polysaccharides qui ont en commun une forte teneur en acide galacturonique et sont constituées par trois types de polysaccharides de structure différente reliés entre eux par des liaisons covalentes. Ces polysaccharides sont :

- les homogalacturonanes (HG) : polymères linéaires constitués de molécules d'acide α -D-galacturonique (GalA), en conformation chaise, liées en α (1-4) ;
- les rhamnogalacturonanes I (RGI) : polymères constitués par la répétition du motif $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow]$ auquel peuvent être attachées des chaînes de type arabinane et galactane ;
- les rhamnogalacturonanes II (RGII) : polymères plus proches des HG avec des chaînes complexes rattachées au motif GalA.

Jusqu'à récemment, les pectines étaient supposées être constituées d'un squelette principal formé par un enchaînement linéaire d'unités d'acides interrompues par une alternance d'unités L-rhamnopyranose (Figure 1.6a). Une structure alternative a été proposée récemment selon laquelle, HG est une longue chaîne linéaire composée de RGI (Figure 1.6b) (Vincken *et al.*, 2003). Malgré ces différences, tous les avis s'accordent à dire que les acides galacturoniques dans la chaîne homogalacturonane peuvent être méthyl-estérifiés en C₆ par du méthanol ou acétylés par de l'acide acétique en C₂ et/ou C₃ conduisant à définir les degrés de méthylation (DM) et d'acétylation (DA).

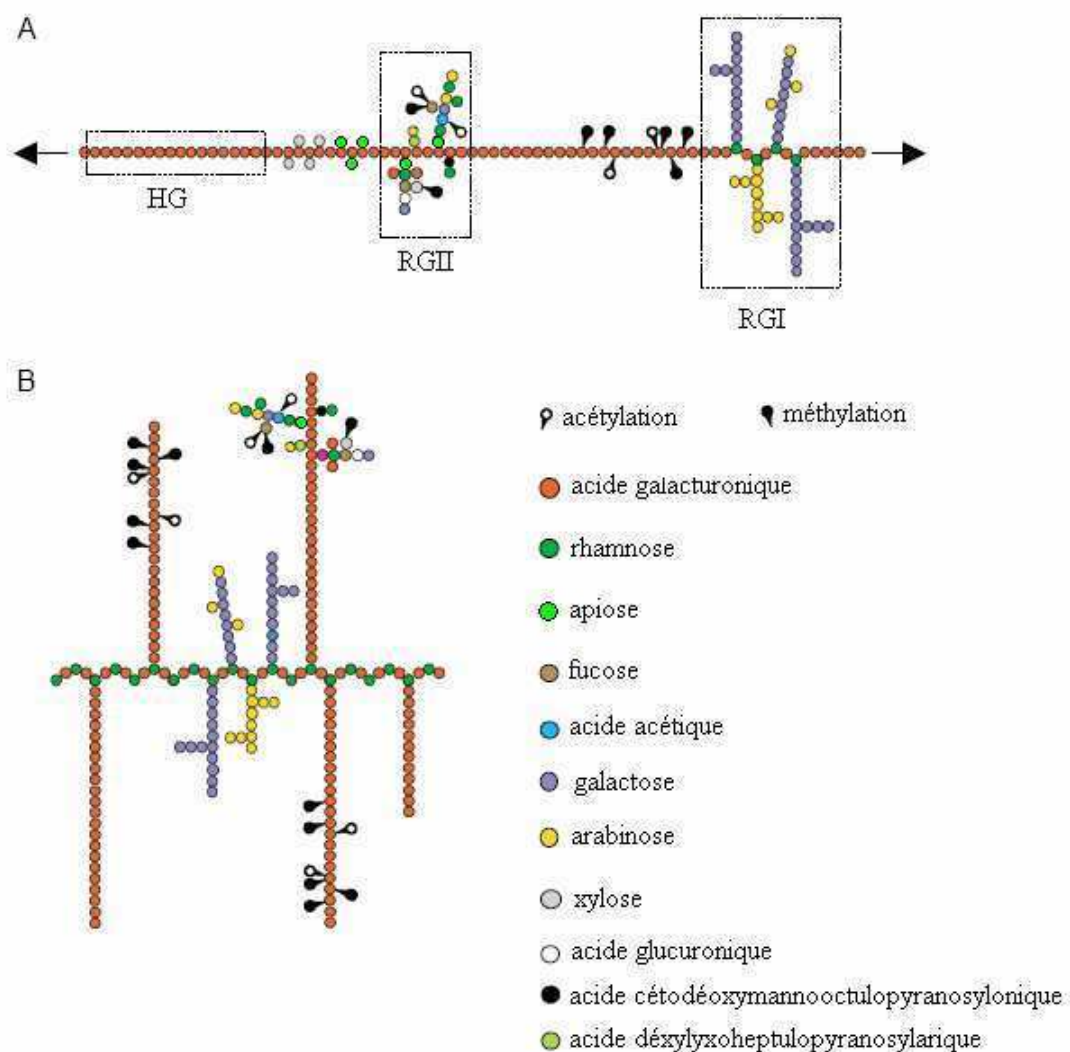


Figure 1.6 : Représentation schématique de la structure d'une macromolécule pectique : a) selon la représentation conventionnelle et b) selon le nouveau modèle proposé par (Vincken *et al.*, 2003) d'après (Willats *et al.*, 2006)

Les pectines sont connues pour leur capacité de gélification et ainsi souvent utilisées dans l'industrie agro-alimentaire en tant que gélifiant. Selon le taux de méthylation des fonctions carboxyliques des acides galacturoniques constitutifs de la chaîne principale des pectines, les modes de gélification diffèrent : « sucre » et acide pour les pectines hautement méthylées, calcium pour les pectines faiblement méthylées par le processus de la « boîte à œufs ». Ce processus est constitué de deux étapes : les chaînes de pectines se rapprochent deux à deux autour des ions calcium (dimérisation) du fait des interactions électrostatiques puis les dimères s'agrègent entre eux pour former un gel (Axelos & Thibault, 1991). De plus, il semblerait que le calcium maintienne les pectines dans un état insoluble au niveau de la membrane cellulaire (Keijbets *et al.*, 1976). Hormis le seul critère du taux de méthylation, la

répartition des groupements méthyles le long de la chaîne principale joue un rôle important dans les processus de gélification.

Les pectines sont assimilables à des polyélectrolytes (présence de groupements carboxyliques) plus ou moins solubles dans l'eau en fonction de la température, de leur degré d'estérification et de leur état d'ionisation, *i.e.* en fonction du pH notamment et de la présence de cations mono-, di- ou trivalents. Les feuilles de thé contiennent environ 10 % de pectines (Selvendran & Perera, 1971).

1.2.2. Les autres composés organiques

En plus des composés de la paroi, les feuilles de thés contiennent différentes familles de composés organiques dont les principaux sont les polyphénols (environ 30 % de la matière sèche) et les alcaloïdes. La teneur en chacun de ces composés dépend de paramètres comme la variété de théier, les conditions de cultures et le procédé de manufacture.

1.2.2.1. Les polyphénols

Les « polyphénols » sont définis comme ayant « tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles » (Sarni-Manchado & Cheynier, 2006). Ces composés sont très répandus dans le monde végétal. Ils interviennent dans différents domaines de la physiologie des plantes (organogenèse, croissance) et dans leurs relations avec l'environnement physicochimique et biologique. Ainsi, ils peuvent servir à favoriser la pollinisation en attirant certains insectes ou au contraire aider à lutter contre les insectes ou les micro-organismes pathogènes pour la plante. De plus, ils contribuent fortement aux qualités organoleptiques des végétaux comme la couleur et l'astringence (Sarni-Manchado & Cheynier, 2006).

Les polyphénols peuvent être classés de différentes manières suivant la complexité du squelette de base et son degré de modification (oxydation, hydroxylation). Les formes les plus simples, par opposition aux formes condensées (tannins) sont divisées en deux catégories :

- les acides phénoliques comprenant les acides hydroxybenzoïques (C_6-C_1) et les acides hydroxycinnamiques (C_6-C_3) ;
- les flavonoïdes ayant en commun la structure de la flavone qui est constituée de deux noyaux benzéniques reliés par une chaîne en C_3 (Figure 1.7).

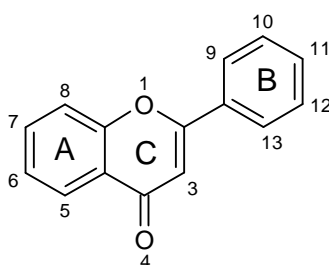


Figure 1.7 : Structure de la flavone (Goodwin, 1965)

Les différentes sous-classes des flavonoïdes sont définies suivant le degré d'oxydation des carbones dans le cycle C. Les principales sous-classes sont présentées dans le Tableau 1.2. Les composés y diffèrent par la présence de groupements hydroxyles. Dans le cas du thé, les flavonoïdes principaux sont les flavonols et les flavon-3-ols (Arce *et al.*, 1998).

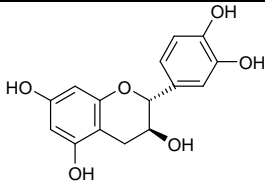
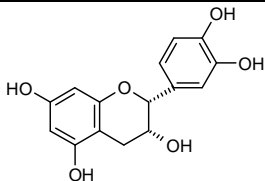
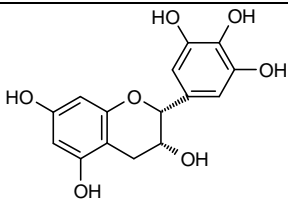
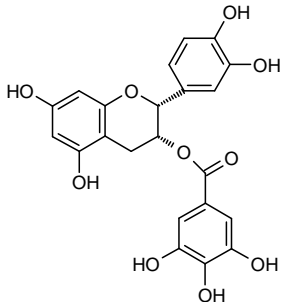
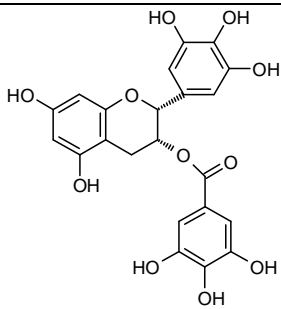
Tableau 1.2 : Les principales sous-classes de la famille des flavonoïdes (Goodwin, 1965)

N°	Nom	Structure	Exemples de composés et position des groupements hydroxyles
1	Flavone		Apigonine : 5, 7, 11 Lutéoline : 5, 7, 10, 11
2	Flavan-3-ols		Catéchine : 5, 7, 10, 11 Gallocatéchine : 5, 7, 10, 11, 12
3	Flavan-3,4-diols		Leucocyanidine : 5, 7, 10, 11 Leucodelphinidine : 5, 7, 10, 11, 12
4	Flavonols		Kaempferol : 5, 7, 11 Quercétine : 5, 7, 10, 11 Myricétine : 5, 7, 10, 11, 12
5	Flavanones		Naringénine : 5, 7, 11 Butine : 7, 10, 11 Eriodictoyl : 5, 7, 10, 11
6	Anthocyanidines		Pélgargonidine : 5, 7, 11 Cyanidine : 5, 7, 10, 11 Delphinidine : 5, 7, 10, 11, 12

1.2.2.1.1. Les flavan-3-ols du thé

Les catéchines appartenant au groupe des flavan-3-ols représentent environ 30 % de la matière sèche des feuilles fraîchement cueillies, 10 à 25 % des feuilles de thé vert et 8 à 21 % des feuilles de thé noir (Zhu *et al.*, 1997). Les principales catéchines du thé sont reportées dans le Tableau 1.3.

Tableau 1.3 : Nom usuel, abréviation, formule et pK_a des principales catéchines du thé^(a)

Nom	Abréviation	Formule développée	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _{a3}	pK _{a4}	Réf.
Catéchine	C		8,64	9,41	11,26	13,26	(1)
Épicatéchine	EC		8,72	9,49	11,23	13,40	(1)
			8,68	9,31	11,28	13,78	(2)
Épigallocatechine	EGC		7,87	9,11	11,87	12,89	(2)
Épicatéchine gallate	ECG		7,74	9,11	11,12	13,15	(2)
Épigallocatechine gallate	EGCG		7,59	10,70			(2)
			7,75	8,0			(3)
(a): force ionique non précisée		(1) : (Kennedy <i>et al.</i> , 1984) (2) : (Kumamoto <i>et al.</i> , 2001) (3) : (Jovanovic <i>et al.</i> , 1995)					

Parmi les catéchines, l'épigallocatechine gallate (EGCG), l'épigallocatechine (EGC) et l'épicatéchine gallate (ECG) sont considérées comme les principales molécules anticancéreuses présentes dans le thé (Arce *et al.*, 1998). Ces composés, comme tous les polyphénols, possèdent des propriétés acides du fait de la présence d'une fonction –OH sur le cycle benzénique (Sarni-Manchado & Cheynier, 2006). Les valeurs des pK_a des flavan-3-ols du thé ont été déterminées (Tableau 1.3). Pour 4 catéchines sur 5, 4 fonctions acides ont été mises en évidence. La valeur des pK_a de première déprotonation varie entre 7,6 et 8,68 suivant les composés.

1.2.2.1.2. Les composés issus de l'oxydation des flavan-3-ols

Lors de la phase d'oxydation, les catéchines incolores, principalement l'EGC, l'EGCG et l'ECG (Muthumani & Kumar, 2006), sont oxydées par les enzymes polyphénoloxydases et peroxydases pour former différents composés dont les plus connus sont les théaflavines (TF) et les théarubigines (TR) qui représentent respectivement jusqu'à 2 % et 20 % de la matière sèche des feuilles de thé noir (Haslam, 2003). Les quantités d'acide gallique et de catéchine semblent rester constantes durant cette phase car les réactions de dégallatation en produisent à partir de l'EGCG, l'ECG et l'EGC (Muthumani & Kumar, 2006).

La formation des théaflavines et des théarubigines commence par une étape commune qui consiste en une oxydation du cycle B des flavan-3-ols en orthoquinone correspondante suivant le mécanisme présenté dans la Figure 1.8 (Haslam, 2003).

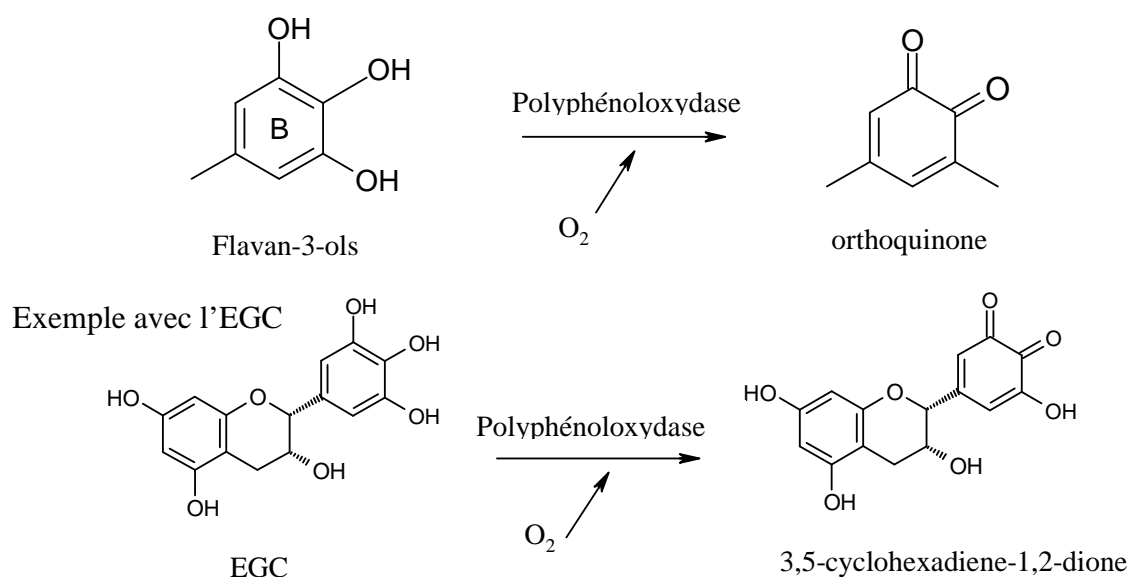


Figure 1.8 : Première étape de l'oxydation des flavan-3-ols par la polyphénoloxydase et exemple dans le cas de l'EGC (Haslam, 2003)

Par la suite, ces dérivés d'orthoquinones peuvent réagir suivant trois voies différentes. La première conduit aux théaflavines par réaction entre le dérivé quinone et un composé possédant une liaison insaturée non substituée : la catéchine, l'épicatéchine ou l'épicatéchine gallate (Figure 1.9).

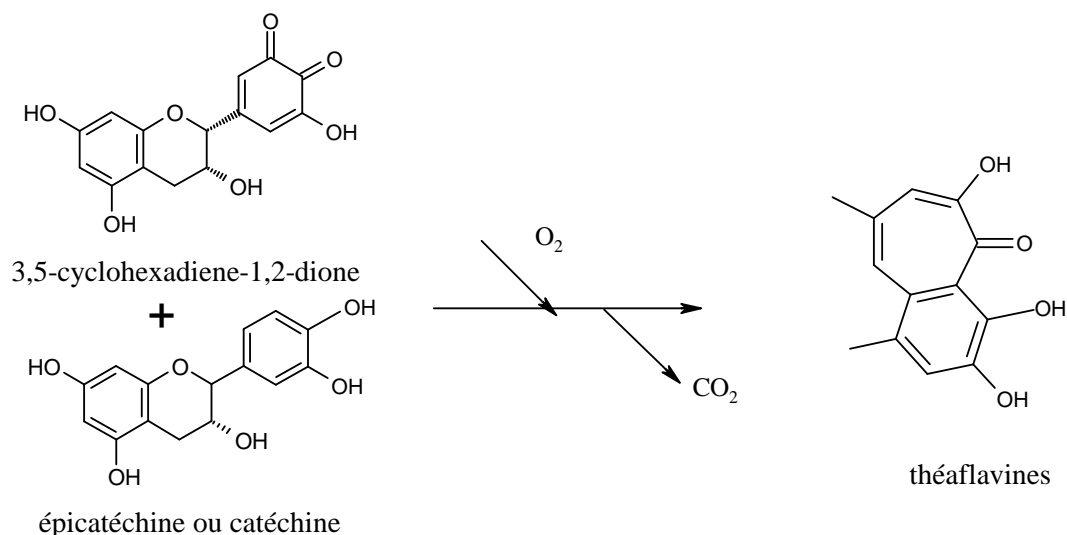


Figure 1.9 : Mécanisme de passage de l'orthoquinone aux théaflavines (Haslam, 2003)

Les théaflavines regroupent la théaflavine (acide faible de pK_a proche de 8 (Spiro & Price, 1987a)), ainsi que les composés possédant un ou plusieurs groupes galloyl comme la théaflavine-3-gallate, théaflavine-3'-gallate et théaflavine-3,3'-digallate (Figure 1.10). Les théaflavines sont des composés de couleur rouge orangé.

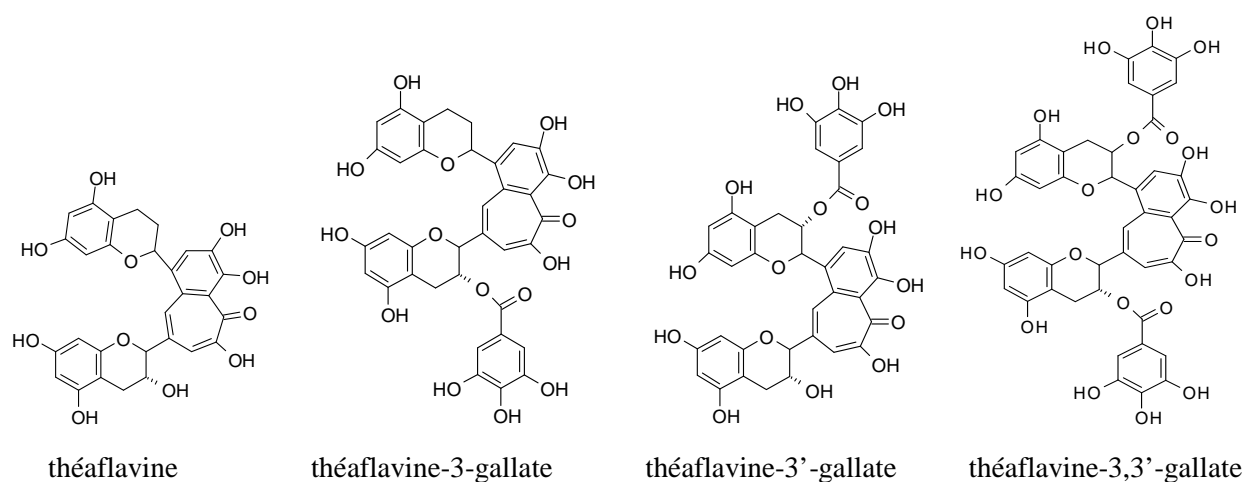


Figure 1.10 : Les théaflavines (Del Rio *et al.*, 2004)

La seconde voie de réaction des dérivés d'orthoquinones conduit à la formation de théasinensines, molécules minoritaires (0,05 et 0,013 % de la matière sèche) découvertes par Nishioka et ses collaborateurs en 1983 (Nonaka *et al.*, 1983). Le mécanisme proposé est présenté dans la Figure 1.11.

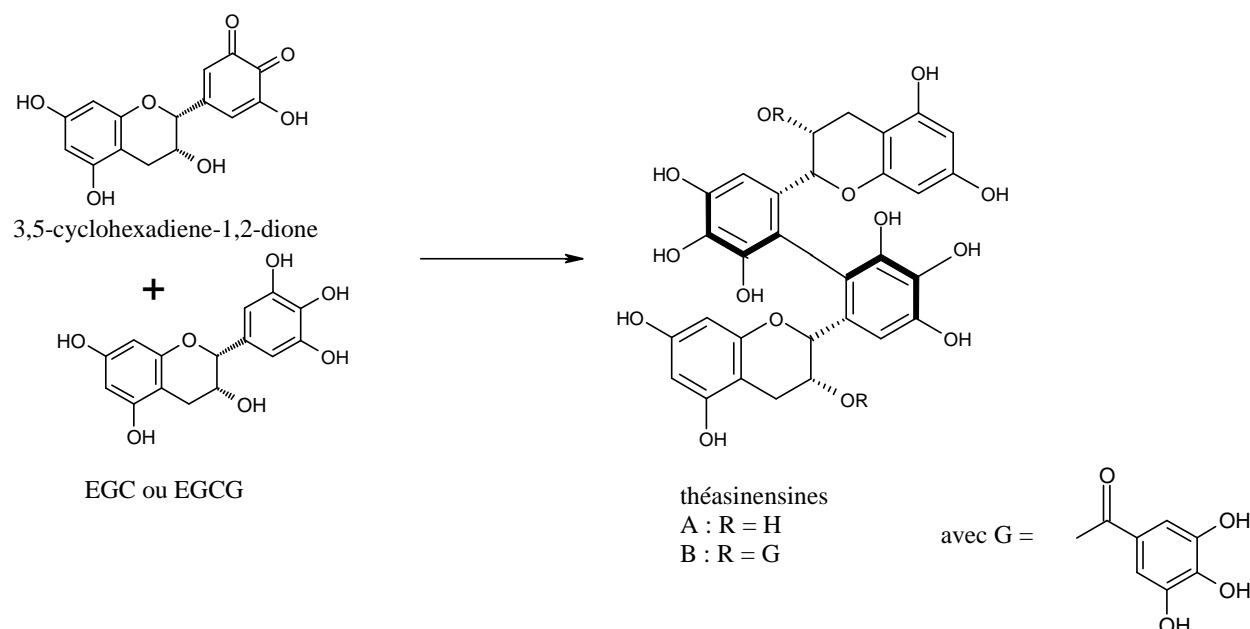


Figure 1.11 : Passage des orthoquinones aux théasinensines (Haslam, 2003)

Les théasinensines sont produites plus facilement que les théaflavines. Leur concentration maximale est atteinte après seulement 2 h d'oxydation contre 4 h pour les théaflavines. À la suite de ces maxima, les concentrations diminuent car les théaflavines et théasinensines semblent être à nouveau oxydées pour produire les théarubigines.

Les théarubigines sont les composés les moins bien connus du thé au niveau de leur structure. Elles ont été définies pour la première fois en 1962 par Roberts (Roberts, 1962). Depuis, de nombreux auteurs ont tenté de les caractériser mais sans succès (Haslam, 2003). À l'heure actuelle, ces molécules sont décrites comme des polymères issus de la réaction des différents composés d'oxydation très solubles dans l'eau. Leur masse moléculaire varierait entre 700 et 2000 Da. Leur couleur, orange tirant sur le marron, serait due à la présence de groupements chromophores formés lors de l'oxydation (Figure 1.12).

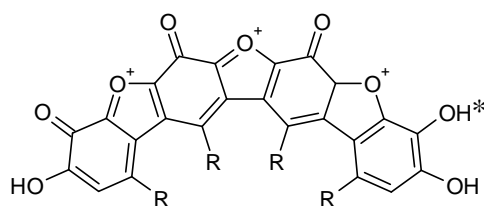


Figure 1.12 : Groupements chromophores susceptibles de se former au sein des théarubigines (R = cycles A ou C de EGC ou EGCG). Les groupements -OH* représentent les sites ionisables des groupements chromophores conférant des propriétés d'acides faibles aux théarubigines (Haslam, 2003)

Cette hypothèse a été proposée par analogie avec l'apparition d'une coloration brune lors de l'introduction du pyrogallol dans une solution basique. Enfin, les théarubigines auraient des propriétés acides grâce à l'ionisation possible des fonctions hydroxyles des groupements chromophores (Figure 1.12).

1.2.2.1.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes ou méthylxanthines appartenant au groupe de la purine présents dans les feuilles de thé sont la caféine (CAF), la théobromine (TB) et la théophylline (TP) (Figure 1.13) (Moreau, 1964). La caféine découverte en 1819 et la théine découverte en 1837 ont été identifiées comme étant une seule et même molécule en 1838. La caféine représente entre 2 et 5 % de la matière sèche des feuilles de thé ; la théobromine entre 0,05 et 0,5 % et la théophylline est souvent inférieure à 0,5 %.

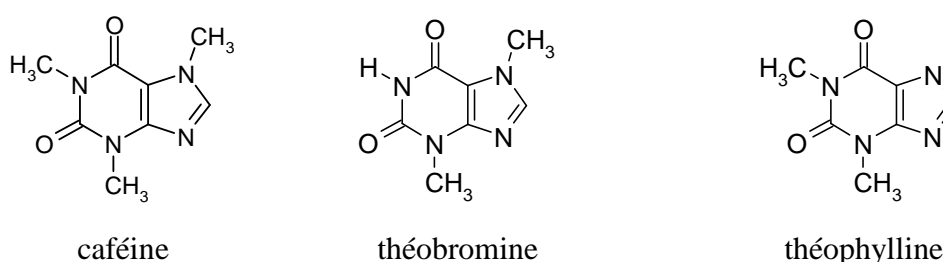


Figure 1.13 : Structure de la caféine, la théobromine (Del Rio *et al.*, 2004) et la théophylline (Zhu *et al.*, 2004)

La caféine ou 3,7-dihydro-1,3,7-triméthyl-1H-purine-2,6-dione est la substance chimique de la famille des alcaloïdes la plus consommée dans le monde par le biais de nombreux aliments et boissons comme le café, les produits chocolatés, le thé ou certaines boissons manufacturées où elle est ajoutée. La caféine et la théophylline sont connues pour leurs effets stimulants au

niveau du système nerveux central et du cœur. Leur consommation excessive peut entraîner des irritations des intestins et induire une dépendance physique (anxiété, fatigue) (Trevisanato & Kim, 2000). Les effets de la théobromine sont similaires aux précédents mais moins marqués sauf pour son caractère diurétique qui est plus important (Moreau, 1964).

1.2.2.2. Les composés volatils et les anions organiques

Les feuilles de thé contiennent également des composés volatils aromatiques. L'étude de ces derniers a commencé il y a 60 ans avec l'identification du linalol, du géraniol et du (Z)-3-hexénol comme composés présents dans la fraction volatile des feuilles ou des liqueurs (Yamanishi & Kobayashi, 1999). Depuis, de nombreuses études ont permis de porter à plus de 600 le nombre de composés volatils identifiés (Shimoda *et al.*, 1995; Schuh & Schierberle, 2006). Les feuilles de thé contiennent également des anions organiques simples comme les formiates, acétates et oxalates (Spiro & Lam, 1995).

1.2.2.3. Technique d'analyse

La littérature fait état de divers modes opératoires pour permettre l'analyse des catéchines et alcaloïdes du thé par HPLC-UV-MS. Les colonnes les plus appropriées sont les colonnes en C18, désactivées, « endcapped » et monomériques. La désactivation permet de limiter les interactions indésirables entre les composés analysés et la partie silicatée de la phase stationnaire (Dalluge *et al.*, 1998). La phase mobile, quant à elle, ne peut pas uniquement être composée de méthanol en mode isocratique et doit contenir de l'acide, les plus utilisés étant le trifluoroacide (TFA), l'acide formique ou encore l'acide acétique. Cet ajout d'acide limite les interactions entre certains composés du thé (comme l'EGCG et l'ECG) et la phase stationnaire.

Il a été établi que les deux phases mobiles suivantes sont équivalentes quant à la qualité de la séparation des catéchines du thé (Dalluge *et al.*, 1998) :

- eau + 0,05 % TFA et acétonitrile + 0,05 % TFA ;
- eau + 0,05% TFA et MeOH-ACN 60/40 + 0,05% TFA.

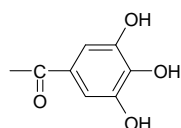
Le couplage de l'HPLC avec la spectrométrie de masse a été également beaucoup utilisé. Différentes études ont été conduites concernant la détection des catéchines et de la caféine dans les échantillons biologiques par spectrométrie de masse, résultats rassemblés dans un aperçu exhaustif de Prasain *et al.* (2004).

Les techniques d'ionisation utilisées lors des couplages sont l'ionisation par électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). L'ESI est mieux adapté à l'étude des catéchines du fait d'une plus grande sensibilité (de l'ordre de 10^{-15} à 10^{-18} mole). L'APCI, préconisée pour des composés dont les masses molaires sont supérieures à 2 000 Da, peut conduire à une décomposition thermique des composés. Ces deux techniques sont sensibles au TFA qu'il est conseillé de remplacer par de l'acide formique ou acétique par exemple. En ionisation ESI, les analyses peuvent être réalisées en mode positif et négatif (Zhu *et al.*, 2004). Les différents fragments représentatifs des composés sont présentés dans le Tableau 1.4.

Tableau 1.4 : Principaux fragments en mode ESI positif

Molécule	Ion moléculaire $[M+H]^+$ (m/z)	Fragments majoritaires (m/z)	Nature des fragments et adduits possibles	Référence
Caféine	195	138	[M-CONCH]	(Song <i>et al.</i> , 2000)
C	291	273	$[M+H-H_2O]^+$	(Zeeb <i>et al.</i> , 2000)
		139	<i>cf.</i> Figure 1.14	
C Dimère	563	603	$[M+Na]^+$	(Atoui <i>et al.</i> , 2005)
		581	$[M+H_2O]^+$	
		291		
		139		
ECG	443	273	$[M+H-galloyl^{(1)}+H-H_2O]^+$	(Zeeb <i>et al.</i> , 2000)
		153	[galloyl+H]	
EGC	307			(Zeeb <i>et al.</i> , 2000)
EGCG (2R,3R)	459	289	$[M+H-galloyl+H-H_2O]^+$	(Zeeb <i>et al.</i> , 2000)
		139	<i>cf.</i> Figure 1.14	
Théobromine	181			(Atoui <i>et al.</i> , 2005)
Théophylline	181			

(1) : groupement galloyl



Les différents fragments obtenus sont présentés dans la Figure 1.14.

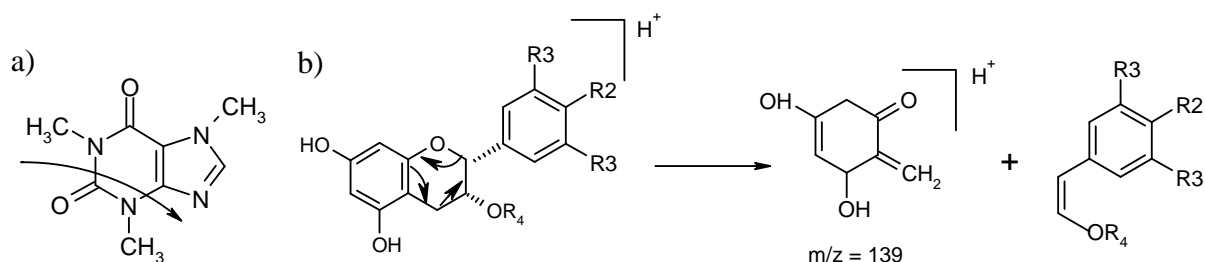


Figure 1.14: Mécanisme de fragmentation : a) la caféine (Atoui *et al.*, 2005), b) les catéchines (Zeeb *et al.*, 2000)

De plus, il peut y avoir formation d'adduit avec le sodium formant ainsi le fragment $[M+23]$. L'ion $m/z = 139$ (Figure 1.14) est caractéristique des catéchines et l'ion $[M+H\text{-galloyl}+H\text{-H}_2O]^+$ est caractéristique des catéchines gallates, la valeur de m/Z différant suivant les catéchines concernées.

1.2.3. Les composés minéraux

L'analyse de feuilles de thé d'origine diverses a montré la présence d'un minimum de quarante éléments minéraux différents dont les ordres de grandeurs des concentrations varient du nanogramme au milligramme par gramme de matière sèche (Odegard & Lund, 1997; Xie *et al.*, 1998; Matsuura *et al.*, 2001). Les teneurs moyennes des feuilles en ces éléments sont reportées dans le Tableau 1.5.

Tableau 1.5 : Concentration totale en éléments minéraux des feuilles de thés verts (TV), thés noirs (TN) et thés *Oolong* (TO)

Thé étudié	Concentration (mg g ⁻¹)						Concentration (µg g ⁻¹)				Réf.
	K	Ca	Mg	Al	Mn	Fe	Na	Zn	Cu	Ni	
1 TN ^(a)	17 ± 1	4,6 ± 0,1	2,07 ± 0,03	0,81 ± 0,06	0,50 ± 0,01	0,13 ± 0,05	37 ± 4	36,6 ± 0,7	27,7 ± 0,7	8,1 ± 0,2	(1)
1 TN	n.m. ^(d)	4,5 ± 0,2	2,28 ± 0,02	0,90 ± 0,01	0,73 ± 0,02	0,13 ± 0,01	n.m. ^(d)	28 ± 2	19 ± 1	6 ± 1	(2)
21 TV ^(b)											
8 TN	20 ± 3	3,4 ± 0,9	n.m. ^(d)	n.m. ^(d)	0,7 ± 0,3	0,3 ± 0,2	n.m. ^(d)	39 ± 9	18 ± 7	8 ± 4	(3)
5 TO ^(c)											

(a) : Thé noir

(b) : Thé vert

(c) : Thé *Oolong*

(d) : non mesuré

(1) : Matsuura *et coll.* (2001)

(2) : Odegard *et coll.* (1997)

(3) : Xie *et coll.* (1998)

L'élément majoritaire est le potassium avec des teneurs de l'ordre de 20 mg g⁻¹ puis viennent le calcium, le magnésium, l'aluminium, le manganèse et le fer. Les teneurs en zinc, cuivre et nickel sont de l'ordre du µg g⁻¹.

Les feuilles de thé contiennent également des anions comme les fluorures, les chlorures, les sulfates et les phosphates présents respectivement à des concentrations de l'ordre de 2 mg L^{-1} , 20 mg L^{-1} , 30 mg L^{-1} et 20 mg L^{-1} (Spiro & Lam, 1995; Lu *et al.*, 2004).

1.3. Des feuilles à la liqueur de thé

1.3.1. Préparation des liqueurs

Les liqueurs, appelées aussi liqueurs par les professionnels ou amateurs de thé, sont obtenues à partir des feuilles de *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Au cours du temps, différentes écoles de préparation du thé se sont succédé. Les principales préparations sont le thé bouilli, le thé battu et le thé infusé qui correspondent à trois dynasties chinoises (Mariage Frères, 2003). L'école du thé bouilli apparaît sous la dynastie des Tang entre 618 et 907 après J.C. Elle consistait à presser le thé sous forme de brique et à le laisser bouillir dans l'eau. De nos jours, les Tibétains consomment encore leur thé de cette manière. La seconde école, dite du thé battu, date de la dynastie des Song (960-1279). Le principe est de disposer les feuilles dans l'eau à $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ puis de les battre pendant 3 min à l'aide d'un fouet en bambou. Cette école a donné naissance à la cérémonie du *Cha No Yu* qui est devenue depuis un véritable « art de recevoir » codifié qui se transmet de génération en génération au Japon. La dernière école du thé, le thé infusé, s'est développée sous la dynastie des Ming (1368-1644), période durant laquelle le thé est apparu en Europe. C'est pourquoi le thé infusé est utilisé par les Européens. Il s'agit de verser l'eau chaude sur les feuilles, de laisser infuser avant de stopper l'infusion en la filtrant pour éliminer les feuilles. En d'autres termes, il s'agit d'une méthode d'extraction dans l'eau le plus souvent chaude de certains composés à partir de la feuille.

La composition des liqueurs dépend de celle des feuilles qui varie suivant leur origine (plantes, sols, grade et procédé de manufacture). Toutefois, le paramètre primordial reste la préparation de la liqueur. Ainsi, les habitudes varient suivant les pays en terme de masse de feuilles utilisée, de masse d'eau ajoutée et de sa température, de durée de l'infusion, de présence ou non d'agitation et enfin d'ajout de sucre, de citron ou de lait (Astill *et al.*, 2001). Par exemple, les sachets de thé vendus au Royaume-Uni contiennent 3,125 g de feuilles contre 2,250 g aux États-Unis et au maximum 2,0 g en Europe (Lakenbrink *et al.*, 2000).

Les paramètres influençant la composition des liqueurs de thé furent étudiés dès le début des années 1960. L'effet de tous ces paramètres sur la composition des liqueurs est développé dans les paragraphes suivants.

1.3.2. Les composés organiques

1.3.2.1. Facteurs influençant l'extraction des composés organiques

Natarajan et ses collaborateurs ont montré en 1962 que plus la température ou le rapport masse d'eau sur masse de feuilles augmente, plus l'extraction des composés à partir des feuilles est importante (Natarajan *et al.*, 1962). Concernant la température de l'eau, les mécanismes expliquant le phénomène n'ont été étudiés que plus tard (Jaganyi & Price, 1998). L'augmentation de la température de l'eau favoriserait sa pénétration dans la feuille mais aussi la dissociation des complexes à faible mobilité ou encore défavoriserait l'adsorption sur la feuille.

Concernant l'extraction des composés, Spiro et ses collaborateurs se sont intéressés plus spécifiquement à la cinétique d'extraction de la caféine, la théaflavine, la théobromine ainsi que les théarubigines à 80 °C dans l'eau déminéralisée. Les résultats sont présentés dans 9 articles rassemblés sous la dénomination *Kinetics and equilibria of tea infusions*, publications 1 à 9, dans le journal *Food Chemistry* entre 1985 et 1987. Dans ces travaux, toutes les constantes cinétiques d'extraction calculées sont basées sur un modèle cinétique de premier ordre établi en utilisant les théories de la double couche et de l'état stationnaire tel que :

$$\ln\left(\frac{c_{\infty}}{c_{\infty} - c}\right) = k_{obs} t \quad \text{Eq. 1.1}$$

où : c = concentration du composé au temps t

c_{∞} = concentration à l'équilibre

k_{obs} = constante cinétique

Ces auteurs ont établi que les théarubigines sont extraites plus rapidement que la caféine qui est infusée elle-même plus rapidement que la théaflavine dans le cas des feuilles brisées (Spiro & Siddique, 1981). Par la suite, ils ont montré que la caféine infuse plus rapidement que la théobromine et la théaflavine dans le cas des feuilles broyées ou brisées (Price & Spiro, 1985). Il semblerait donc que, dans ces cas, la vitesse d'extraction des composés organiques étudiés suive l'ordre : TR > CAF > TF (Figure 1.15). Cette séquence d'extraction est différente du rendement d'extraction à l'équilibre. En effet, le rendement d'extraction de la caféine est plus important que celui des théarubigines lui-même supérieur à celui des théaflavines (Spiro & Siddique, 1981; Lakenbrink *et al.*, 2000). En fonction du type de traitement subi par les feuilles utilisées, il est possible d'extraire 90 % de la caféine rapidement, 2 min pour les feuilles broyées (Lakenbrink *et al.*, 2000) ou 7 min pour les

feuilles brisées (Spiro & Siddique, 1981), alors qu'une durée d'infusion de 30 min est nécessaire pour atteindre la même valeur dans le cas des théarubigines. Seulement, 60 % des théaflavines sont extraites au bout de 30 min.

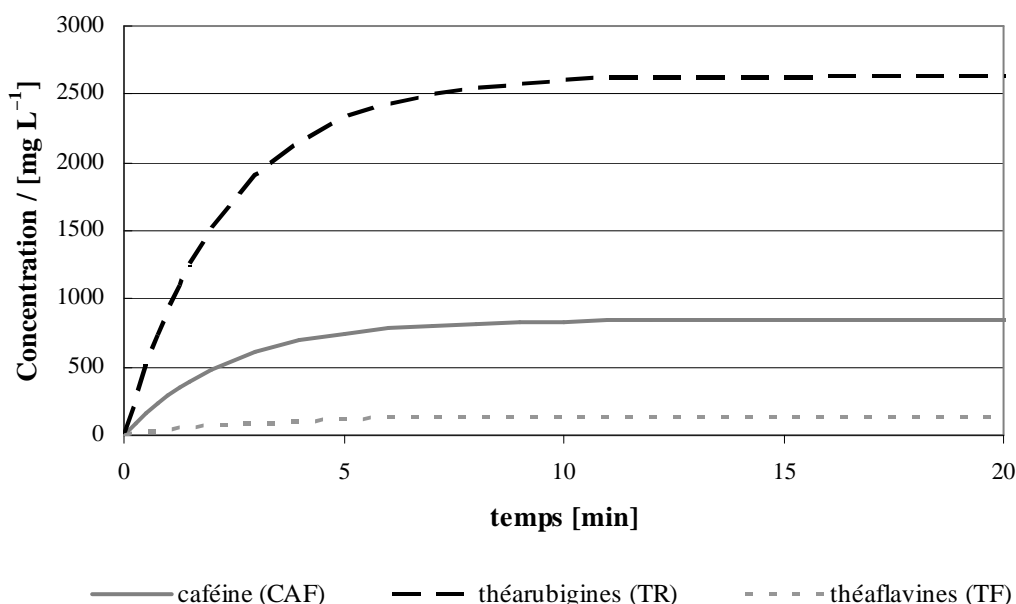


Figure 1.15 : Évolution de la concentration en caféine, théaflavines et théarubigines dans les liqueurs de thé d'après le modèle cinétique développé par Spiro et Siddique (1981)

Par ailleurs, les catéchines sont stables au-moins 7 h en milieu légèrement acide (Zhu *et al.*, 1997). Par contre, elles sont instables en milieu alcalin, surtout les formes esters (ECG et EGCG) du fait de la présence des trois groupements hydroxyles adjacents. Les analyses RMN ont montré qu'au sein des liqueurs de thé, la caféine est présente sous forme de polymères (dimères, trimères...) alors que la théaflavine est exclusivement sous forme de dimères (Charlton *et al.*, 1999).

Le procédé de manufacture subi par les feuilles influence également les rendements d'extraction. Ainsi, les feuilles traitées par le procédé orthodoxe ont un taux d'extraction plus faible que les feuilles traitées par le procédé CTC (Price & Spiro, 1985). Ceci serait dû au fait que les cellules sont plus endommagées dans le dernier cas. Par ailleurs, considérant des feuilles ayant subi le même traitement, le taux d'extraction augmente si la taille des feuilles diminue. Un autre paramètre important est la composition chimique de l'eau (Spiro & Price, 1987a; 1987b; Spiro *et al.*, 1987). La composition de l'eau peut influencer la vitesse, représentée par k_{obs} , ou la durée d'extraction ainsi que la concentration finale à l'équilibre (c_{∞})

mesurée après 20 min d'infusion. Les principaux résultats concernant la caféine et la théaflavine sont rassemblés dans le Tableau 1.6.

Tableau 1.6 : Influence du pH et de la teneur en sels de l'eau sur l'extraction de la caféine et de la théaflavine (Spiro & Price, 1987a; 1987b)

	pH	Caféine		Théaflavine	
		c_{∞} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$k_{\text{obs}}^{(1)}$ (min^{-1})	c_{∞} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$k_{\text{obs}}^{(1)}$ (min^{-1})
Eau UP	4,8	2970	1,51	293	0,97
Sels ajoutés ($I = 0,11 \text{ mol L}^{-1}$)					
NaCl	4,8	2840	1,32	298	0,98
KCl	4,8	2900	1,30	287	1,13
CaCl ₂	4,8	2680⁽²⁾	1,09	284	0,75
NaO ₃ SPh	4,8	2940	1,58	292	1,11
Bu ₄ NCl	4,8	3040	1,64⁽³⁾	306	1,07
Tampon citrate	3,0	2860	1,23	401	0,97

(1) : l'incertitude déterminée par la réalisation des analyses en duplicats est de $0,08 \text{ min}^{-1}$

(2) : valeurs en gras : diminution supérieure à 5 %

(3) : valeurs en gras et en italique : augmentation supérieure à 5 %

Concernant l'ajout de sels, l'effet du CaCl₂ est le plus significatif car il diminue la quantité totale extraite (c_{∞}) ainsi que la constante cinétique (k_{obs}) de la caféine et de la théaflavine. La présence des autres sels induit seulement une légère diminution de k_{obs} pour les deux composés. L'effet particulier du calcium serait dû à sa capacité à complexer les produits d'hydrolyse de la pectine présente dans la paroi cellulaire qui deviendrait alors plus rigide (Spiro *et al.*, 1987). Par ailleurs, pour de faibles durées d'infusion, l'extraction des théaflavines est légèrement inférieure en présence de CaCl₂. Cet effet est contradictoire avec les résultats d'une étude précédente (Anderson *et al.*, 1971) selon laquelle la présence de calcium dans l'eau n'aurait aucune influence sur l'extraction des composés polyphénoliques. L'acidification de l'eau utilisée conduit à une extraction plus importante de la théaflavine et à une diminution de k_{obs} dans le cas de la caféine. L'acidité pourrait endommager la feuille et favoriser la libération de la théaflavine.

1.3.2.2. Complexation des molécules organiques

Les polyphénols peuvent former des complexes avec les ions métalliques moyennant l'échange d'un ou deux protons. Ils peuvent aussi interagir avec d'autres molécules présentes

dans le milieu comme les protéines ou d'autres polyphénols au travers de liaisons hydrogène ou d'interactions coulombiennes (ion phénate) ou hydrophobes (Sarni-Manchado & Cheynier, 2006).

Ces propriétés jouent un rôle important dans le cas des liqueurs de thé avec formation de :

- la crème de thé, « *tea cream* » : la liqueur de thé se trouble lors du refroidissement de la liqueur ;
- l'écume de thé, « *scum* » : un dépôt huileux se forme à la surface de la liqueur (Figure 1.16).

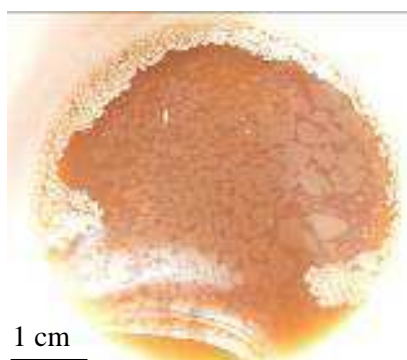


Figure 1.16 : Formation d'écume de thé à la surface d'une liqueur de thé noir contenant du calcium et des hydrogénocarbonates (ce travail) (photographie comparable aux travaux de Spiro et Jaganyi (1994))

L'apparition de la crème et de l'écume est plus importante dans les liqueurs de thé noir. De nombreux auteurs se sont intéressés à l'apparition de la crème de thé et à sa composition. En effet, ce phénomène est peu apprécié des consommateurs et constitue également un frein au développement des boissons froides.

1.3.2.2.1. La crème de thé

Les premières études faisaient état d'une interaction entre la caféine et les flavan-3-ols non polymérisés dans le cas des thés vert ou *Oolong* et entre la caféine et les théaflavines et théarubigines dans le cas des thés noirs avec une présence indispensable de la caféine (Roberts, 1963; Collier, 1972). Les sites mis en jeu ont été déterminés par RMN et sont les cycles A et C, *i.e.* cycles oxygénés, dans le cas des catéchines simples (EC, C, EGC), le groupement ester galloyle pour les formes esters (EGCG, ECG) et le cycle flavane dans le cas des théaflavines, cycle libéré du fait de la dimérisation au niveau du cycle benzotropolone. Le

mécanisme d'interaction entre la théaflavine et la caféine proposé en 1999 par Charlton est présenté dans la Figure 1.17.

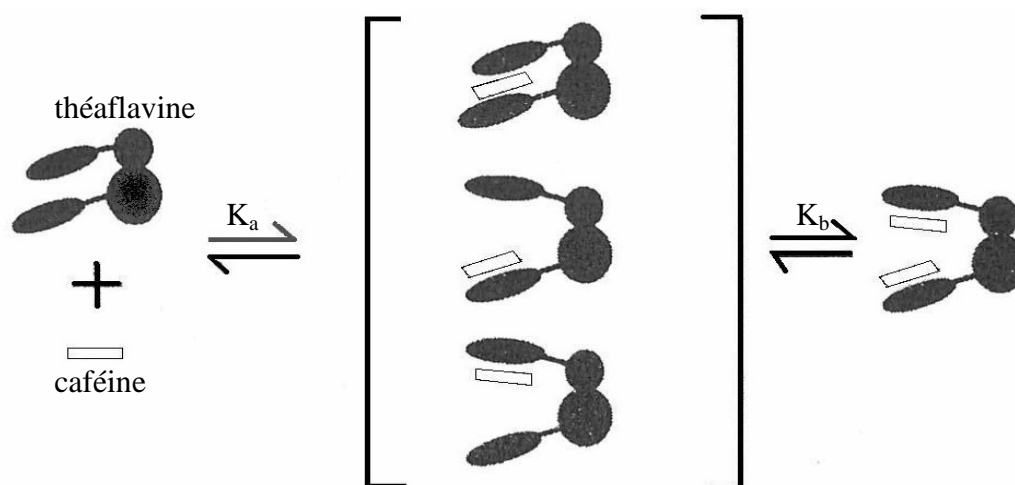


Figure 1.17 : Modèle d'interaction théaflavine-caféine avec $K_a = 11,9 \text{ L mol}^{-1}$ et $K_b = 16,5 \text{ L mol}^{-1}$ constantes d'association entre la caféine et la théaflavine (Charlton *et al.*, 1999) (Notation et Abréviations)

De plus, les formes esters, possédant plus de groupements hydroxyles que les catéchines simples, participeraient préférentiellement à la formation de la crème de thé (Chao & Chiang, 1999a; 1999b).

D'autres auteurs en étudiant une liqueur de thé non modifiée, dite « classique », et une liqueur décaféinée ont mis en évidence que la présence de la caféine n'est pas indispensable à l'apparition de la crème de thé mais qu'elle ne ferait que la stimuler en présence de groupements galloyls (Penders *et al.*, 1998a; Penders *et al.*, 1998b; Penders *et al.*, 1998c; Jöbstl *et al.*, 2005). Dans ce modèle, l'association entre les polyphénols consisterait en des empilements de molécules entre lesquels viendrait s'insérer la caféine. Il en résulterait une augmentation de la taille des particules formées. Cette insertion serait favorisée par les liaisons hydrogène existant entre les groupements phénols et les molécules de caféine par l'intermédiaire de l'atome d'azote ou de l'un des groupements amino-cétone. La crème de thé apparaîtrait selon un mécanisme en deux étapes, apparition puis maturation, dans lesquelles interviendraient des composés de nature différente.

Ces structures supra-moléculaires auraient des constantes de formation augmentant lorsque la température diminue et deviendraient ainsi moins solubles à faible température. Cette insolubilité expliquerait l'apparition de la crème de thé (Jöbstl *et al.*, 2005). La formation de la crème peut être caractérisée par trois régions différentes : stable, métastable et instable. La

« *cream-line* » sépare les régions stable monophasique et métastable alors que la « *spinodal boundary* » sépare les régions métastable et instable diphasique. Cette zone métastable est très étroite dans le cas de la liqueur classique.

Au vu de ces résultats (Figure 1.18), (Jöbstl *et al.*, 2005) ont conclu que, dans la liqueur décaféinée, il est possible d'accéder à la région métastable où la séparation de phases est contrôlée par les phénomènes de condensation et de germination nécessitant le franchissement de la barrière d'énergie. Cependant, dans la plupart des cas, la formation de crème est contrôlée par la séparation de phases suivant la décomposition spinodale due à l'insolubilité des polyphénols.

Par ailleurs, les composés ont des affinités différentes pour la phase crème et la phase aqueuse. Il semblerait ainsi que les théaflavines, et la caféine dans une moindre mesure, sont plus présentes dans la phase crème tandis que les catéchines restent dans la phase aqueuse. En absence de caféine, l'EGCG est de préférence dans la phase crème.

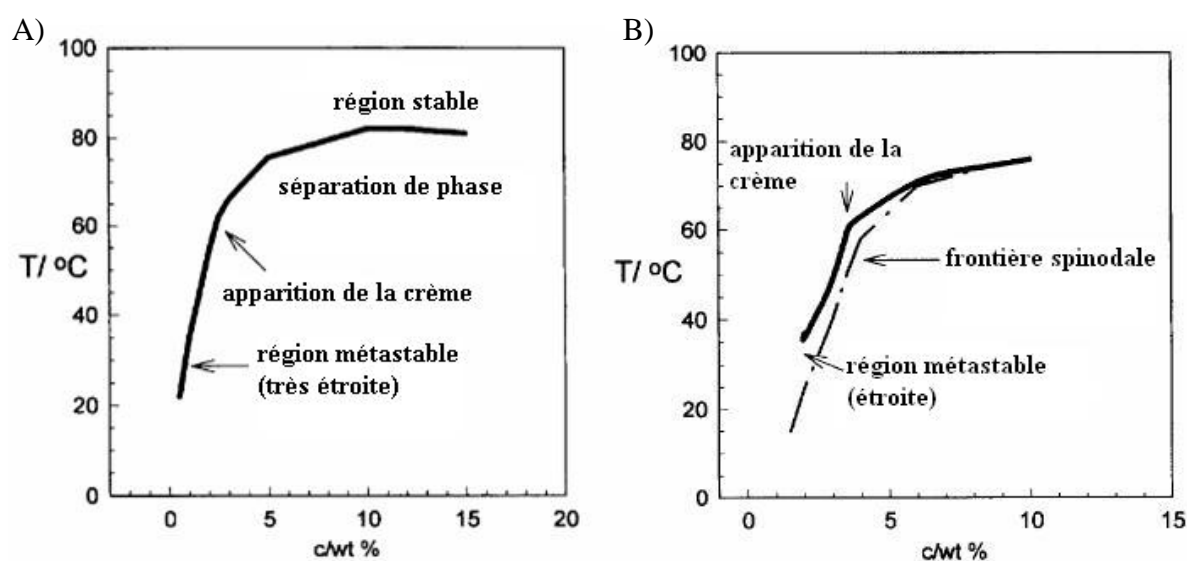


Figure 1.18 : Comportement des phases lors de la formation de crème de thé (température en fonction du rapport masse de feuilles sur masse d'eau (c/wt %)) : a) Liqueur classique ; b) Liqueur décaféinée (Penders *et al.*, 1998c)

Certains paramètres influenceraient la quantité de crème obtenue tels que l'ajout de calcium, *e.g.* 66 % du calcium initialement présent dans la liqueur se retrouve dans la crème (Chao & Chiang, 1999b), la glycosylation des polyphénols, le nombre de groupements galloyls et le pH. Le Tableau 1.7 rassemble les résultats des différents travaux relatifs à la crème de thé.

Tableau 1.7 : Résumé des paramètres influençant la formation de crème de thé

Paramètres	Conséquence sur la crème	Explications	Réf.
Augmentation du rapport feuille/eau	Tc ⁽¹⁾ et M ⁽²⁾ augmentent	La solubilité des polyphénols diminue lorsque leur concentration augmente	Penders <i>et al.</i> , 1998b
Dégallatation	Tc et M diminuent	La solubilité des polyphénols augmente en absence de groupements galloyls	
Augmentation de la température d'extraction	M augmente	Extraction des polyphénols augmente	Chao et Chiang, 1999b
Diminution du pH	Tc augmente	pH proche du point iso-électrique des théaflavines donc la coagulation et la sédimentation sont favorisées	Penders <i>et al.</i> , 1998c
		L'acidité conduit à plus de solides dans la liqueur et favorise les interactions avec les polysaccharides	Liang et Xu, 2001
Ajout de calcium	Tc augmente	Les répulsions électrostatiques sont diminuées par la neutralisation des charges négatives des théaflavines au pH des liqueurs et les colloïdes sont déstabilisés	
Présence de caféine	Tc diminue et M augmente	La caféine s'insère entre les empilements de polyphénols et conduit à une augmentation de la taille des particules et une diminution de la solubilité des empilements	Jöbstl <i>et al.</i> , 2005
Glycosylation des polyphénols	M diminue	Les groupes fixés empêchent les empilements des polyphénols par encombrement stérique et limitent la formation de colloïdes	

(1) : température d'apparition de la crème ; si Tc augmente, la formation de crème de thé est favorisée

(2) : masse de crème formée

D'après Harbron et ses collaborateurs (Harbron *et al.*, 1989), la crème est constituée de petites gouttes sphériques monodispersées de quelques micromètres de diamètre (pour un rapport thé/eau de 5 %), stabilisées par des effets électrostatiques qui empêchent la coagulation. Les effets électrostatiques sont dus à la présence des fonctions acides ionisées au pH des liqueurs (environ 4 à 5). En fait, la taille des ces gouttelettes serait de quelques nanomètres lors de l'apparition de la crème (Jöbstl *et al.*, 2005), puis de 40 à 160 nm lors de son développement pour ensuite atteindre quelques micromètres à maturation (Penders *et al.*, 1998a; Penders *et al.*, 1998b; Penders *et al.*, 1998c).

Les effets de la caféine du café, comme l'excitation, se font moins sentir lors de la consommation de thé car sa complexation avec les polyphénols semble ralentir le processus

d'assimilation. De ce fait, les effets stimulants se ressentent plus tardivement et plus longtemps (Pettigrew, 1997). Des incertitudes existent sur les réels phénomènes de complexation et leurs effets sur la biodisponibilité de la caféine dans le thé.

1.3.2.2.2. L'écume de thé

La première étude sur le sujet date de 1940 (Kooijmans, 1940). À l'époque, cet auteur a décrit deux types d'écumes, l'une dépendant de la composition de l'eau et l'autre non. Par la suite, Spiro et ses collaborateurs n'ont cependant réussi à mettre en évidence qu'un seul type d'écume (Spiro & Jaganyi, 1993).

L'écume serait constituée de complexes organiques majoritairement formés par l'interaction entre la caféine et les polyphénols ainsi que par des éléments minéraux comme le sodium, provenant de l'eau, le potassium, le manganèse et l'aluminium provenant entièrement des feuilles et le magnésium provenant des feuilles et de l'eau dans les mêmes proportions. Ce dépôt résulterait de l'oxydation des composés solubles du thé par l'oxygène de l'air. Cette oxydation est possible du fait de la présence de calcium et de carbonates sous forme de carbonate de calcium représentant 15 % de la masse totale.

Sa formation dépend de différents paramètres tels que le pH de la liqueur, la surface exposée à l'air, le temps de maintien à 80 °C après la fin de l'infusion ainsi que la qualité d'eau utilisée. Plus le pH est acide moins la quantité de dépôt est importante. Par contre, l'augmentation de la surface exposée à l'air et du temps de chauffage favorise sa formation qui n'a lieu qu'en présence d'air. Enfin, l'eau doit contenir des ions calcium et carbonate introduits séparément pour son obtention. Faire bouillir l'eau ne permet pas de l'éliminer mais contribue à en diminuer la quantité formée. L'énergie d'activation de l'écume est de 34 kJ mol⁻¹, montrant que le phénomène est contrôlé par des mécanismes chimiques et non diffusionnels (Spiro & Jaganyi, 1994b).

1.3.3. Les composés minéraux

1.3.3.1. Composition des liqueurs

La composition minérale des liqueurs de thé est, à l'image des feuilles, très diverse tant au niveau des éléments détectés, jusqu'à quarante, que de leur concentration, huit ordres de grandeur séparant l'élément le plus concentré de celui le moins concentré (Odegard & Lund, 1997; Matsuura *et al.*, 2000; Matsuura *et al.*, 2001). Les concentrations en éléments minéraux obtenues lors de ces travaux sont reportées dans le Tableau 1.8.

Les éléments peuvent être classés en trois groupes suivant leur rendement d'extraction :

- extraction forte (> 55 %) : sodium, potassium et nickel ;
- extraction moyenne (20 à 55 %) : magnésium, aluminium, manganèse et zinc ;
- extraction faible (< 20 %) : calcium, fer et cuivre.

Tableau 1.8 : Composition minérale des liqueurs de thé

Thé	Concentration (mg L ⁻¹)						Concentration (µg L ⁻¹)				Réf.
	K	Ca	Mg	Al	Mn	Na	Fe	Zn	Cu	Ni	
1 TV ^(a)	250 ± 40	2,8 ± 0,3	16 ± 2	4,0 ± 0,4	4,2 ± 0,4	1,0 ± 0,3	43 ± 5	200 ± 30	22,9 ± 0,3	68 ± 8	(1)
1 TN ^(b)	300 ± 20	4,03 ± 0,02	19,6 ± 0,6	5,5 ± 0,2	5,2 ± 0,2	0,72 ± 0,07	180 ± 30	288 ± 2	102 ± 4	125 ± 5	
1 TN	n.m. ^(c)	2,5 ± 0,6	9 ± 2	3,2 ± 0,2	2,2 ± 0,5	n.m. ^(c)	41 ± 5	140 ± 30	80 ± 20	38 ± 3	(2)

(a) : TV, thé vert

(b) : TN, Thé noir

(c) : non mesuré

(1) : Matsuura *et al.* (2001)

(2) : Odegard *et al.* (1997)

De plus, il semblerait que les cations ont tendance à diffuser de la feuille vers la liqueur moins rapidement que les anions. Ce comportement serait dû à des liaisons entre les cations et les composés phénoliques qui gêneraient leur extraction (Spiro & Lam, 1995).

1.3.3.2. Fractionnement et spéciation

Les études portant sur les éléments minéraux ont principalement été focalisées sur leur fractionnement et leur spéciation. La spéciation est définie comme étant la distribution des différentes formes ou espèces chimiques d'un élément donné dans un milieu tandis que le fractionnement est la distribution entre groupes d'espèces chimiques d'un élément donné ayant un comportement commun (Templeton *et al.*, 2000). Les différents groupes pris en compte lors des études de fractionnement peuvent être :

- ion libre / complexes très labiles / complexes peu labiles ;

- élément dans la phase dissoute / dans la phase colloïdale / dans la phase particulaire ;
- ion libre / complexes inorganiques / complexes organiques ;
- Formes disponibles / peu disponibles / non disponibles.

La labilité d'un complexe traduit, de façon générale, la rapidité avec laquelle il se dissocie sous l'effet d'une perturbation (Buffle, 1988). L'étude de la spéciation et du fractionnement est importante puisque les propriétés biologiques des éléments ainsi que leur toxicité varient selon la forme chimique sous laquelle ils sont présents comme par exemple le chrome, beaucoup plus toxique sous la forme Cr(VI) que Cr(III) (Templeton *et al.*, 2000).

1.3.3.2.1. L'aluminium

L'élément le plus étudié dans les liqueurs de thé est l'aluminium car *Camellia sinensis* a la faculté de l'accumuler dans ses feuilles conduisant à des teneurs particulièrement élevées dans les liqueurs.

L'aluminium est présent à des concentrations importantes, de l'ordre du milligramme par litre, dans les liqueurs de thé, ce qui en fait l'une des sources majeures pour les consommateurs. Or cet élément est reconnu comme étant un puissant neurotoxique, il peut également être toxique pour les cellules hématopoïétiques et le squelette, touchant plus particulièrement les patients sous dialyse, à cause d'une insuffisance rénale chronique ((Wills & Savory, 1983) dans (Flatén, 2002)). Le principal sujet de controverse à son sujet reste sa possible implication dans le déclenchement de la maladie d'Alzheimer même si certaines études ont démontré le lien de cause à effet entre la quantité d'aluminium absorbée et l'expression de cette maladie (Wisniewski & Wen, 1992; Flatén, 2001). Il est généralement peu absorbé par le système gastro-intestinal, environ 0,1 % de la quantité journalière ingérée, mais cette absorption dépend de sa spéciation ((Priest *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 2000) d'après (Flatén, 2002)). L'aluminium sous forme de complexe avec le citrate est plus absorbé que sous forme d'hydroxy-complexes par exemple (Priest *et al.*, 1996). Afin de mieux connaître les mécanismes d'intoxication à partir des liqueurs de thé, de nombreuses études de spéciation et de fractionnement ont été menées. Elles s'accordent à dire qu'une très large partie de l'aluminium est liée à la matière organique mais elles divergent quant à la taille des molécules. Le Tableau 1.9 présente quelques uns des principaux résultats concernant le fractionnement de l'aluminium en fonction de la taille des molécules organiques (MO) avec lesquelles il est lié. Ces données ont été rassemblées par Flatén (2002).

Tableau 1.9 : Étude de la spéciation ou du fractionnement de l'aluminium dans les liqueurs de thé (Flaten, 2002)

Fraction de l'aluminium total liée à la MO	Fractionnement de l'aluminium	Méthode utilisée	Réf.
91-100 %	86 % > 20 000 Da 4 % < 5 000 Da	Échange cationique et ultrafiltration	(French <i>et al.</i> , 1989)
pH normal : 100 %	14 % avec des espèces de haute masse moléculaire 86 % ≤ 2 100 Da	Chromatographie d'exclusion stérique	(Owen <i>et al.</i> , 1994)
pH stomacal (≈ 2) :	100 % < 2 100 Da		
85 %	15 % > 30 000 Da 70 % < 3 000 Da	Ultrafiltration	(Powell <i>et al.</i> , 1993)
75 %	30 % entre 6500 et 8 500 Da 45 % entre 4 000 et 6 000 Da	Chromatographie d'exclusion stérique	(Odegard & Lund, 1997)
Non donnée	1 pic entre 4000 et 6500 Da	Chromatographie d'exclusion stérique	(Flaten & Lund, 1997)

La taille des complexes comportant de l'aluminium est variable entre chaque étude. Cependant les conditions acides, comme celles rencontrées dans l'estomac, semblent favoriser la libération de Al^{3+} . Une étude par passage de la liqueur sur résine Chelex 100 a permis de déterminer les formes de l'aluminium présentes dans trois liqueurs de thé, des données thermodynamiques comme les constantes conditionnelles de complexation de l'aluminium avec la matière organique mais aussi la concentration d'aluminium libre, Al^{3+} , au pH des liqueurs (Alberti *et al.*, 2003).

Tableau 1.10 : Analyse de fractionnement de l'aluminium par passage de liqueurs de thé sur une résine Chelex 100 (Alberti *et al.*, 2003)

Thé	pH	Proportion et force des complexes entre Al et la MO	Log $\alpha_M^{(2)}$	$K_1^{(1)}$	Al^{3+} (%)
Noir (Darlington)	5,36	100 % - très stable	5,11	n.c. ⁽³⁾	n.d. ⁽²⁾
Vert (Sir Wiston)	5,56	idem	5,38	n.c. ⁽³⁾	n.d. ⁽²⁾
Noir (Sri Lanka)	5,58	9,2 % - très stable 90,8 % - moins stable	5,59	n.c. ⁽³⁾ $10^{7,49}$	0,007

$$(1) : \beta_{app} = \frac{[Métal - ligand]}{[Métal][Ligand]}$$

$$(2) : \alpha_M = 10 K^* \frac{w}{V}, \text{ coefficient de réaction limite avec } K^* : \text{ rapport entre la concentration en métal sorbé sur}$$

le résine et celle du cation libre dans la liqueur ; w : la masse de résine et V : le volume de liqueur. Si le coefficient de réaction des complexes est supérieur à cette valeur, le complexe n'est pas dissocié en présence de la résine et le cation ne peut être adsorbé sur la résine

(3) : non détecté

(4) : non calculable

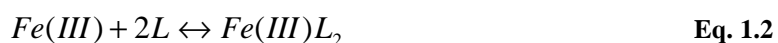
Les résultats (Tableau 1.10) sont en accord avec ceux présentés dans le Tableau 1.9 quant à la présence d'aluminium sous forme de complexes avec des composés de type polyphénols (acide gallique par exemple) pour les complexes les moins stables et de type polyphénols polymérisés (théaflavine par exemple) pour les plus stables.

L'aluminium peut également se complexer avec d'autres éléments comme les ions fluorure, (environ 10 %) et les ions citrate (Zhou *et al.*, 1996; Kralj *et al.*, 2005). La proportion d'ion libre, Al^{3+} , est donc faible dans les liqueurs de thé.

1.3.3.2.2. Le fer

Seuls Odegard et Lund (1997) ont étudié la spéciation du fer directement dans les liqueurs de thé. Les autres études portent sur des solutions aqueuses modèles de complexes organo-ferriques présents dans le thé. Odegard et Lund (1997) ont rapporté que la majeure partie du fer, entre 51 et 91 %, contenu dans les liqueurs de thé est sous forme cationique, le reste étant complexé avec des molécules de taille comprise entre 4000 à 6000 Da. Une étude plus récente (Yaman & Kaya, 2005) montre que le fer serait présent à 82 % sous forme d'ion ferreux, la fraction restante, 18 %, étant sous forme de fer ferrique. Cependant dans cette étude, l'analyse de la complexation du fer avec la matière organique est absente. Or il semblerait que le fer ferrique puisse former des complexes avec les catéchines des thés verts et noirs ainsi qu'avec les composés issus de la fermentation présents seulement dans les thés noirs tels que la théaflavine (O'Coinceanainn *et al.*, 2004).

Jovanovic *et al.* (1998) ont étudié la stœchiométrie des complexes du fer avec les catéchines à pH 7. Puis ils ont évalué les valeurs de leur constante apparente de formation (β_{app}) par mécanisme de compétition avec l'EDTA. En effet, ils ont laissé 30 min le fer en présence des catéchines pour atteindre l'équilibre avant d'ajouter l'EDTA (Tableau 1.11). L'équilibre considéré avec les catéchines est le suivant :



Avec L représentant EGCG, EGC et ECG.

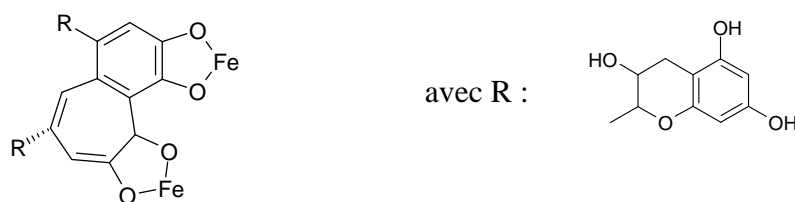
Tableau 1.11 : Valeurs des pK_a des catéchines seules dans l'eau, stœchiométrie (N) des complexes Fe(III)(ligands)_n et leurs constantes de complexation (Jovanovic *et al.*, 1998; Kumamoto *et al.*, 2001)

Ligands	N	pK_{a1} pour les catéchines dans l'eau ^(a)	Complexes ^(b)	pK_{a2} pour les catéchines dans l'eau ^(a)	Complexes ^(b)	β_{app} ^(c)
C	3	Non étudié				
EGCG	2	7,59	4,40	10,70	7,40	4.10^{27}
EGC	2	7,9	4,90	9,11	8,60	$2,5.10^{27}$
ECG	2	7,74	4,30	9,11	7,30	2.10^{27}

(a) pK_a valeur évaluée dans l'eau (Kumamoto *et al.*, 2001)(b) seuls Fe^{3+} et le ligand sont présents dans le milieu aqueux(c) constante apparente de stabilité calculée par compétition avec l'EDTA ($\log \beta = 25,0$ pour [FeEDTA]). Les pK_a de l'EDTA sont donnés en Annexe 1.

La catéchine est la seule molécule dont la stœchiométrie des complexes avec le fer est 2 mais ils n'ont pas été étudiés dans le travail présenté dans le Tableau 1.11. La différence de stœchiométrie entre la catéchine, $n = 3$, et les formes gallates, $n = 2$, proviendrait du nombre de groupes hydroxyles disponibles, 3 pour la partie gallate et 2 pour la catéchine. De plus, il semblerait que la complexation des catéchines avec le fer diminue leur pK_a ainsi que leur pouvoir anti-oxydant.

Concernant la théaflavine, une proposition de structure pour le complexe formé est représentée dans la Figure 1.19 dans le cas d'un excès de fer (O'Coinceanainn *et al.*, 2004). Par contre, ce complexe n'est pas stable dans les conditions d'acidité de l'estomac. En effet, il se décompose en sous-produits, majoritairement en théanaphtoquinone. Parallèlement le fer ferrique est réduit en fer ferreux.

**Figure 1.19 : Structure du complexe Fe(III)-théaflavine (O'Coinceanainn *et al.*, 2004)**

Toutes les études s'accordent à dire que les sites privilégiés pour la complexation du fer sont les atomes d'oxygène du cycle gallate, sachant que lorsque ces sites sont protonés, les groupes esters peuvent également participer à la complexation.

1.3.3.2.3. Le manganèse

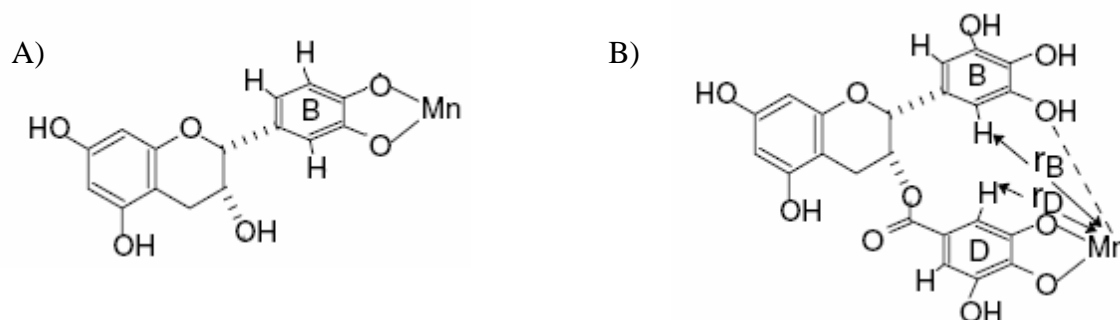
Ozdemir et Gucer (1998) ont étudié la spéciation du manganèse dans les feuilles et les liqueurs de 5 thés différents. Les principaux résultats sont reportés dans le Tableau 1.12.

Tableau 1.12 : Spéciation du manganèse au sein des feuilles et des liqueurs de thé (Ozdemir & Gucer, 1998)

Feuilles		Liqueurs	
Formes présentes	% de Mn total	Formes présentes	% de la fraction soluble
inorganique	32,5 % soluble dans l'eau	cationique (Mn^{2+})	95 %
	67,5 % non soluble à l'eau (oxyde)	anionique	< limite de détection
		complexe organique	5 %

Navarro *et al.* (2005) ont étudié la structure des complexes avec la matière organique (5 %) par RMN en mesurant la variation du temps de relaxation du spin des protons des catéchines T_1 en fonction de la quantité d'ion paramagnétique Mn^{2+} ajoutée dans le milieu.

La complexation de l'ion Mn^{2+} se ferait par formation d'un cycle 1,2-diolate auquel participerait préférentiellement le cycle gallate (Figure 1.20) et le cycle B en l'absence du précédent.



1.3.3.2.4. Les autres éléments

L'étude du fractionnement des autres éléments essentiels a été réalisée par Odegard et Lund (1997). Ainsi à pH 5,5, deux groupes de composés sont répertoriés. Les éléments sont présents sous forme :

- cationique non associée à la matière organique : cas du magnésium ;
- majoritairement cationique et aussi non cationique (complexé à la matière organique : cas du calcium, du nickel, du cuivre et du zinc.

Les formes non cationiques correspondent à des complexes entre matière minérale et matière organique dont la taille varie entre 4 000 et 6 000 Da pour le nickel, le cuivre et le zinc. Par opposition au fer, le cuivre se complexerait majoritairement avec les atomes d'oxygène des cycles A et B (Miller *et al.*, 1996).

Le Tableau 1.13 rassemble les principaux résultats concernant le fractionnement des éléments minéraux dans les liqueurs de thé.

Tableau 1.13 : Résumé du fractionnement des éléments minéraux dans les liqueurs de thé

Éléments	Formes	Tailles des complexes	Références
Ca	Majoritairement cationique Non cationique		(Odegard & Lund, 1997)
Cu	Majoritairement cationique Non cationique	4000 – 6000 Da	(Odegard & Lund, 1997)
Mg	Cationique non associée à la matière organique		(Odegard & Lund, 1997)
Zn	Majoritairement cationique Non cationique	4000 – 6000 Da	

1.3.4. Analyse sensorielle

Cette méthode d'évaluation a été développée dans les années 1930 pour pallier un manque d'outils analytiques dans le domaine des agro-ressources. Elle met en œuvre des techniques « qui utilisent les sens humains (audition, goût, olfaction, somesthésie, vision) pour mesurer les qualités sensorielles ou la qualité hédonique d'un produit » (Association Française de Normalisation, 1999). La qualité sensorielle est « l'ensemble des propriétés d'un produit perçues par les sens, liées à la fois au produit et à la perception qu'en ont les juges ». C'est une description objective du produit contrairement à la qualité hédonique qui est « l'appréciation affective que portent des consommateurs sur un produit sur la base de ses propriétés sensorielles ».

1.3.4.1. Les méthodes d'évaluation sensorielle

Les épreuves hédoniques sont basées sur la mesure du degré de plaisir procuré par un produit lors de sa dégustation auprès d'un groupe identifié de consommateurs. Ils permettent

d'identifier l'acceptabilité ou la préférence d'un produit alimentaire. Ces essais sont réalisés par des juges naïfs et représentatifs de la population (minimum 60 personnes) sachant que le contexte dans lequel ils sont réalisés et l'état physiologique du juge ont une influence.

Les épreuves analytiques permettent de mesurer les caractéristiques sensorielles d'un produit, en les suivant dans le temps, en les comparant ou en les contrôlant. Ces essais analytiques sont divisés en deux grandes familles : les tests discriminatifs et descriptifs. L'analyse discriminative permet une différenciation basée sur la perception globale, qualitative et quantitative simultanément. L'Analyse Descriptive Quantitative permet de décrire les produits à l'aide de descripteurs et d'échelles de notations, sur la base de perceptions indépendantes qualitatives et quantitatives. Cette analyse est réalisée par un jury composé au minimum de 10 juges qualifiés. Ces juges sont sélectionnés puis entraînés sur les descripteurs sensoriels.

Les descripteurs ou termes utilisés sont primordiaux et doivent répondre à diverses exigences déterminant le succès de l'analyse. Ils doivent être absolument pertinents, précis, *i.e.* dépourvus de toute ambiguïté, et discriminants, *i.e.* permettre de différencier les produits, mais aussi exhaustifs et indépendants. Ils peuvent être prédéfinis par consensus entre les juges lors des séances d'entraînement, imposées par l'animateur ou libres, *e.g.* chaque juge établit sa propre liste. Lorsqu'ils sont obtenus par consensus du panel, les termes soumis par les juges sont triés pour éliminer les termes hédoniques et non appropriés dans un premier temps. Puis les plus pertinents sont sélectionnés et les non discriminants supprimés. Les séances d'analyse doivent se faire dans un temps limité, le plus souvent une semaine. Durant une séance, au maximum six échantillons peuvent être présentés au juge suivant un ordre aléatoire basé sur un plan d'expérience équilibré. Ils sont présentés de façon anonyme, *e.g.* code à trois chiffres pris au hasard, et homogène (quantité, récipient ...).

1.3.4.2. Le traitement des données

Les traitements statistiques permettent de connaître pertinence des notes données par le panel et de déterminer l'importance de chacune (Lagarde, 1983). Les méthodes les plus utilisées sont l'analyse de variance (ANOVA) et l'analyse en composantes principales (ACP).

L'ANOVA permet de savoir si les différences entre les classes d'échantillons sont dues au hasard ou si elles sont imputables à un facteur. La différence intra-classe doit être inférieure à la différence inter-classe (O'Mahony, 1986). Le rapport (F) est défini comme le rapport entre la variance intra-classe ou variance résiduelle et la variance inter-classe ou variance expliquée. Cette valeur, F, est comparée à la valeur théorique afin de conclure sur le caractère discriminant. Généralement, F est transformé en valeur p suivant le nombre d'individus par

classe et p représente la probabilité pour que la variance de la variable soit due au hasard ou à d'autres facteurs que celui ayant servi pour le classement. Le seuil est généralement fixé à 5 % soit $p < 0,05$.

L'objectif de l'analyse en composantes principales (ACP) est de représenter au mieux la variabilité du système dans un nombre réduit de plans. Pour chaque plan, les axes, suivant les « composantes principales » sont obtenus par combinaisons linéaires des axes originaux. La pertinence de ce schéma dépend du taux de variance expliqué par les composantes principales utilisées pour la représentation. Les variables sont représentées sur un cercle allant de -1 à 1. Plus la valeur absolue de la variable est grande, plus elle est significative. Dans ce cercle, si deux variables ont la même direction, elles sont « corrélées » et discriminent les individus de la même manière.

1.3.4.3. Évaluation sensorielle du thé

La procédure de préparation des liqueurs de thé en vue de leur évaluation sensorielle est précisée dans la norme ISO 3103:1980 (International Organisation for Standardisation, 1981). Les liqueurs doivent être réalisées dans un pot en faïence ou en porcelaine blanche muni d'un couvercle. Après infusion, la liqueur est versée dans un bol en porcelaine ou faïence blanche en maintenant le couvercle du pot en place afin de retenir les feuilles. Le couvercle est ensuite reposé sur le pot après avoir été retourné pour permettre l'examen des feuilles (Figure 1.21). Le diamètre du pot peut être de 81 ± 2 mm ou 62 ± 2 mm et celui du bol de 109 ± 3 mm ou 86 ± 3 mm. Ces dimensions sont prévues pour que le pot muni de son couvercle puisse se trouver entièrement au-dessus de la surface interne du bol lorsque l'on verse la liqueur.



Figure 1.21 : Pots et bols réglementaires pour la préparation d'une liqueur de thé : Pot pendant et après infusion

Les liqueurs de thé possèdent de nombreuses caractéristiques organoleptiques qui sont propres à chaque type de thés, qu'ils soient verts ou noirs. Pour ces derniers, une norme rassemble les principaux descripteurs utilisés (International Organisation for Standardisation, 1982). Les principales caractéristiques des liqueurs de thé concernent leur odeur, leur apparence et leur goût. L'odeur est due à la présence d'au minimum 600 composés organiques volatils identifiés (1.2.2.2). La couleur et les principaux goûts que sont l'amertume et l'astringence sont dus à la diversité des composés organiques (Cai *et al.*, 1990). L'astringence, plus particulière au thé, est définie comme « une sensation complexe résultant de la contraction de la surface des muqueuses de la bouche, produite par des substances telles que les tannins du kaki et de la prune» (Association Française de Normalisation, 1992). Il s'agit en fait d'une sensation de dessèchement de la bouche due au contact entre deux surfaces non « lubrifiées ». Dans le cas du thé noir, elle serait due à la complexation des polyphénols avec des protéines de la bouche (Haslam, 1998) et les complexes obtenus auraient des solubilités variables. Cette sensation peut dépendre de la morphologie de chacun. Une étude a montré que la nature de l'eau a une influence sur les qualités organoleptiques notamment l'amertume, l'astringence et la couleur mais les mécanismes responsables de ces modifications n'ont pas été identifiés (Pangborn *et al.*, 1971).

1.3.5. Importance de l'eau utilisée pour les liqueurs

L'eau apparaît comme un élément fondamental dans la réalisation des liqueurs de thé. Sa composition, notamment sa dureté, semble affecter l'extraction et la complexation de la matière organique (*cf.* 1.3). Dans le monde, la plupart des consommateurs utilisent l'eau du robinet pour réaliser les liqueurs. Or, la qualité des eaux disponibles varie fortement d'un pays à un autre. Un programme des Nations Unies nommé « The United Nations Global Environment Monitoring System (GEMS) Water Program » a été mis en place avec pour but de fournir des informations sur la qualité des eaux dans le monde. Ces données concernent les eaux de surface ainsi que les eaux souterraines. La dureté des eaux correspondant aux pays consommant le plus de thé est donnée dans le Tableau 1.14. Concernant la France, les eaux analysées sont des eaux de surface. Bien que la plupart des eaux de consommation soient issues des eaux souterraines, cela donne des indications sur la composition des eaux.

Tableau 1.14 : Dureté des eaux dans les pays consommateurs de thé (GEMS, 2007)

Pays	Dureté (mg CaCO ₃ L ⁻¹)			Type d'eau	Nombre de sites analysés
	Minimum	Médiane	Maximum		
Chine	12	151	3335	Surface	495
Inde	0	400	13510	Surface	4338
				Souterraine	1123
Royaume-Uni	4	155	457	Surface	823
				Souterraine	4
France	31	145	268	Surface	1038
Russie	0	96	688	Surface	2196

L'ensemble des études concernant le thé a montré que l'influence de la composition physico-chimique de l'eau a été étudiée pour l'extraction de la caféine et de la théaflavine mais les conclusions obtenues lors de ces études sont contradictoires (Anderson *et al.*, 1971; Spiro & Price, 1987a). De plus, peu d'informations sont disponibles quant à l'effet de la composition de l'eau sur l'extraction de la matière minérale et des polyphénols totaux ainsi que les mécanismes responsables de la modification des qualités organoleptiques.

Afin de compléter les données de la littérature, l'objectif de ce travail a été de compléter les données de la littérature. Pour cela, nous avons déterminé la composition des liqueurs en matière organique et minérale en fonction de l'eau utilisée en limitant au maximum les étapes d'extraction, d'ajustement de pH ou toute autre manipulation pouvant induire une modification des équilibres au sein des liqueurs. De plus, le manque de données concernant les mécanismes responsables des modifications des qualités organoleptiques nous a conduits à réaliser une analyse sensorielle en fonction des différentes eaux. Finalement, nous avons étudié les liens pouvant exister entre ses données physico-chimiques et les caractéristiques organoleptiques afin de déterminer les paramètres les plus influents dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'extraction et de complexation existants dans les liqueurs de thé.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	47
2.1. MATÉRIEL	47
2.1.1. <i>Thés</i>	47
2.1.2. <i>Eaux</i>	48
2.1.3. <i>Réactifs</i>	48
2.2. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	50
2.2.1. <i>Préparation des liqueurs de thé</i>	50
2.2.1. <i>Filtration et ultrafiltration</i>	51
2.2.2. <i>Minéralisation</i>	52
2.3. MÉTHODES D'ANALYSES	52
2.3.1. <i>Caractérisation des feuilles de thé</i>	52
2.3.1.1. Taille des feuilles	52
2.3.1.2. Loupe binoculaire	54
2.3.1.3. Humidité relative	54
2.3.1.4. Surface spécifique	54
2.3.1.5. Isotherme d'adsorption de vapeur d'eau	55
2.3.1.6. Analyse élémentaire	56
2.3.2. <i>Caractérisation des échantillons</i>	56
2.3.2.1. Paramètres physico-chimiques	56
2.3.2.1.1. pH, conductivité et masse volumique	56
2.3.2.1.2. Dosage des composés minéraux	57
2.3.2.1.3. Dosage des anions majeurs	58
2.3.2.1.4. Détermination de la matière organique	59
2.3.2.2. Résonance magnétique nucléaire	64
2.3.2.3. Détermination de la mobilité électrophorétique	66
2.3.2.4. Observations et analyses au microscope électronique à balayage (MEB-EDS)	67
2.3.2.5. Analyse sensorielle	68
2.3.2.5.1. Préparation des échantillons	68
2.3.2.5.2. Juges	69
2.3.2.5.3. Élaboration du profil sensoriel de quatre thés	69
2.3.2.5.4. Profil sensoriel d'un thé avec cinq eaux	69
2.3.2.5.5. Traitement des données	70

Chapitre 2. Matériel et Méthodes

Ce chapitre présente l'ensemble des réactifs, du matériel et des méthodes analytiques utilisés au cours de ce travail.

2.1. Matériel

2.1.1. Thés

Sept thés noirs et deux thés verts présentés sous formes de feuilles entières et de feuilles broyées ont été étudiés (Tableau 2.1 et Figure 2.1).

Tableau 2.1 : Thés utilisés

Type	Pays	Région	Nom	Abréviation ⁽¹⁾	Type de feuilles
Noir	n.c. ⁽²⁾	n.c. ⁽²⁾	Lipton Yellow	LS	broyées
	n.c. ⁽²⁾	n.c. ⁽²⁾	Lipton Lemon	LC	
	Inde	Darjeeling	Ambootia	Am	entières
			Namring	M8	
			North Tukvar	Nt	
			Nurbong	Nu	
			Oaks	M6	
Vert	Chine	Hu Bei	Xia Zhou Bi Feng	M2	entières
		Guang Xi	Lin Yun	M5	
				M5 B	broyées ⁽³⁾

(1) : ces abréviations seront celles utilisées dans la suite du manuscrit

(2) : n.c. : non communiqué

(3) : les feuilles ont été broyées manuellement à l'aide d'un mortier et d'un pilon en agathe.

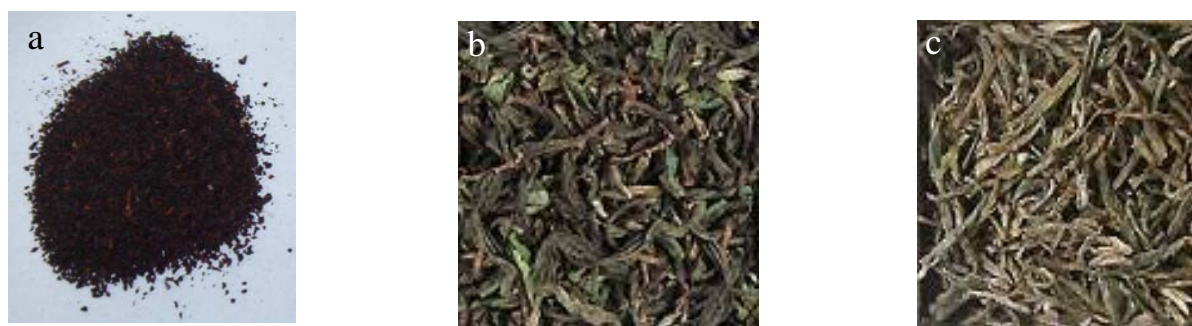


Figure 2.1 : Feuilles de thé avant infusion : a) thé noir broyé LS, b) thé noir M6 en feuilles entières et c) thé vert M2 en feuilles entières

Chaque type de thé en feuilles entières contient des feuilles récoltées en même temps dans un même jardin (millésime 2004). Ces jardins sont situés en Inde dans la région de Darjeeling pour les thés noirs et en Chine pour les thés verts. Par opposition, les thés en feuilles broyées (thés commerciaux en sachet) sont obtenus par « *blend* » (*i.e.* mélanges de feuilles provenant de différents jardins) et le fournisseur n'a pas souhaité nous communiquer la provenance des feuilles. Les thés noirs en feuilles entières sont obtenus par le procédé de manufacture orthodoxe alors que les thés en feuilles broyées ont subi le traitement CTC (Broyer-Déchiquter-Enrouler).

2.1.2. Eaux

Les différentes eaux utilisées (Tableau 2.2) sont l'eau ultra pure UP du laboratoire, quatre eaux minérales naturelles ainsi que quatre eaux obtenues par ajout de différents sels de calcium à l'eau Mont-Roucous. Ces dernières sont préparées à l'aide d'une balance de précision et de fioles jaugées de 1 L. Elles seront appelées par la suite « eaux synthétiques ».

Tableau 2.2 : Eaux utilisées : des eaux naturelles ou eaux « synthétiques »

Nature de l'eau	Nom	Nature du sel ajouté	Masse de sel ajoutée (mg) pour 1 L d'eau	Abréviation
	Ultra pure			UP
	Cristaline, source St Médard			Cr
Eaux minérales naturelles	Mont-Roucous	—	—	MR
	Thonon	—	—	T
	Volvic	—	—	V
	Vittel	—	—	Vi
Eaux synthétiques	Mont-Roucous avec CaCl_2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	530,35	MR + CaCl_2 B ⁽¹⁾
	Mont-Roucous avec CaCl_2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	735,50	MR + CaCl_2 H ⁽¹⁾
	Mont-Roucous avec CaCO_3	CaCO_3	483,20	MR + CaCO_3
	Mont-Roucous avec CaSO_4	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	830,00	MR + CaSO_4

(1) : B pour Basse concentration et H pour Haute concentration en CaCl_2

2.1.3. Réactifs

L'ensemble des réactifs utilisés lors des expériences est rassemblé dans le Tableau 2.3.

Tableau 2.3 : Réactifs utilisés

Réactif	Pureté	Fournisseur	Référence
eau UP		Millipore	
eau deutérée (D ₂ O) 25 mL	99,90 %	Euriso-top	X2121
acide acétique 100 %	HPLC grade	VWR	20-108-292
acide nitrique 69 % 1L	RP Normapur		1004522500
acide nitrique 69 % 2L	Reagent purum	Riedel-deHaën	30702
acide fluorhydrique 49,1 %		J.T. Baker	9563-01
eau oxygénée 30 %	Normapur	VWR	23619297
soude décarbonatée 50-52 %	HPIC grade	Fluka	72064
soude normalisée 0,4962 N		Aldrich	319503-2L
acétonitrile		Scharlau	AC0333
éthanol	HPLC grade	Scharlau	ME0315
méthanol gradient d'élution		VWR	20-865-297
éthanol absolu anhydre		API Vailhauques	
étalon sept anions (F, Br, Cl, NO ₂ , NO ₃ , PO ₄ , SO ₄)		Dionex	57590
solution multi-élémentaire à 100 µg mL ⁻¹ (Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, Hg, Ni, Ag, M, V, Zn)		CPI-international	CCS-6
solution multi-élémentaire à 100 µg mL ⁻¹ (Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cs, Ga, Ln, Li, Mg, K, Rb, Se, Na, Sr)		CPI-international	CCS-4
solution tampon pH = 4,01		Fisher Bioblock	w-16251
solution tampon pH = 7,01		Scientific	w-16252
réactif de Folin-Ciocalteu		VWR	31360.264
<i>zeta potentiel transfer solution</i>		Malvern	DTS 1050
<i>3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid, sodium salt hydrate (TMPS) 5 mg</i>	99+%	Acros organic	17665
hydrogénophthalate de potassium	≥ 99 %	Nacalai tesque	449-35
carbonate de sodium anhydre	≥ 99 %	Nacalai tesque	449-36
hydrogénocarbonate de sodium	≥ 99 %	Nacalai tesque	449-37
CaCl ₂ ·2H ₂ O, chlorure de calcium		COOPER	1 124 225
CaSO ₄ ·2H ₂ O, sulfate de calcium		COOPER	1 132 725
CaCO ₃ , carbonate de calcium		COOPER	1 123 125
sulfate d'aluminium et de potassium	Officinale	COOPER	1 050 225
acide citrique		COOPER	1 009 933
acide tannique		COOPER	1 774 100
acide tartrique		COOPER	1 018 125
NaNO ₃ , nitrate de sodium	≥ 99 %	Fluka	71755
carbonate de sodium anhydre		VWR	27767.295
(-)-épicatéchine gallate (ECG)		Extrasynthese	0978S
(-)-épigallocatechine (EGC)		Extrasynthese	0979S
(-)-épigallocatechine gallate (EGCG)		Extrasynthese	0981S
catéchine (C)	> 99 %	Extrasynthese	0976S
épicatéchine (EC)		Extrasynthese	0977S
acide gallique (AG)		Extrasynthese	6079
théobromine (TB)	≥ 98 %	Fluka	88304-100g
théophylline (TP)	≥ 99 %	Fluka	88308-100g

L'eau est adoucie et distillée avant de passer dans un système échangeur d'ions *Milli-Q® Ultrapure Water Purification System Gradient A10* (Millipore, catalogue N° ZMQS 5V0 T1). Cet appareil est composé de trois étapes de filtration : une cartouche contenant des résines anioniques et cationiques (Q-Gard™, QGARD00R1), une cartouche à polissage (Quantum, N° QTUM000EX), et un filtre final à 0,22 µm (Millipak-40 Filter Unit, stérile, MPGL04SK2). L'appareil présent au laboratoire possède également une lampe UV (185/254 nm, ZFA10UV01) afin de détruire toute matière organique et un analyseur de carbone organique total en ligne. L'eau de qualité ultra haute pureté (UP) ainsi obtenue a une résistivité de 18,2 MΩ cm (25 °C) et une teneur en carbone organique inférieure à 5 µg L⁻¹.

2.2. Préparation des échantillons

2.2.1. Préparation des liqueurs de thé

L'eau et les feuilles sont respectivement pesées à l'aide de balances précises à 0,1 g et 0,1 mg près. Dans le cas des thés en sachet, les feuilles sont préalablement retirées du sachet. Puis l'eau est chauffée jusqu'à la température de 95 °C contrôlée à l'aide d'une sonde de température analogique *Checktemp 1* (Hanna). L'eau chauffée est ensuite versée sur les feuilles et laissée en contact pendant 3 min, temps contrôlé à l'aide d'un chronomètre précis à 1 s près. La liqueur de thé est filtrée à l'aide d'une passoire en nylon afin de retirer les feuilles. Une fois à température ambiante (20 à 25 °C), la liqueur est pesée à nouveau. Différents rapports entre la masse de feuilles et la masse d'eau sont utilisés (Tableau 2.4). Ces rapports sont ceux préconisés par les fournisseurs de thé afin d'être en accord avec les liqueurs consommées.

Tableau 2.4 : Rapports entre les masses de feuilles et d'eau utilisées pour réaliser les liqueurs

Type	Abréviation	Masse de feuilles : masse d'eau (m : m, %)
Noir	LS	0,6
	LC	
	Am	2
	M8	
	Nt	
	Nu	
Vert	M6	1,7
	M2	2,5
	M5	

Après infusion, les échantillons sont stockés soit dans un flacon en polyéthylène pour l'analyse des éléments minéraux soit dans un flacon en verre pour l'analyse de la matière organique afin de limiter les contaminations croisées.

2.2.1. Filtration et ultrafiltration

Pour l'analyse des éléments minéraux ou organiques, les liqueurs ont dû être filtrées au préalable avec des filtres embouts de seringues possédant un seuil de coupure de 0,45 μm en acétate de cellulose (Nalgène). Ce seuil de coupure correspond à la délimitation entre la matière organique particulaire et la matière organique dissoute (Leenheer & Croue, 2003).

De plus, pour relier les composés organiques et certains éléments à une fraction, les liqueurs sont également ultrafiltrées séquentiellement à l'aide d'une cellule d'ultrafiltration *Amicon Bioseparations* (Millipore) et de membranes en polyéthersulfone Biomax (PB) (Millipore) possédant des seuils de coupure de 100, 30 et 5 kDa. Les filtrations sont réalisées sous pression d'azote à 0,8 bar suivant le protocole détaillé dans la Figure 2.2.

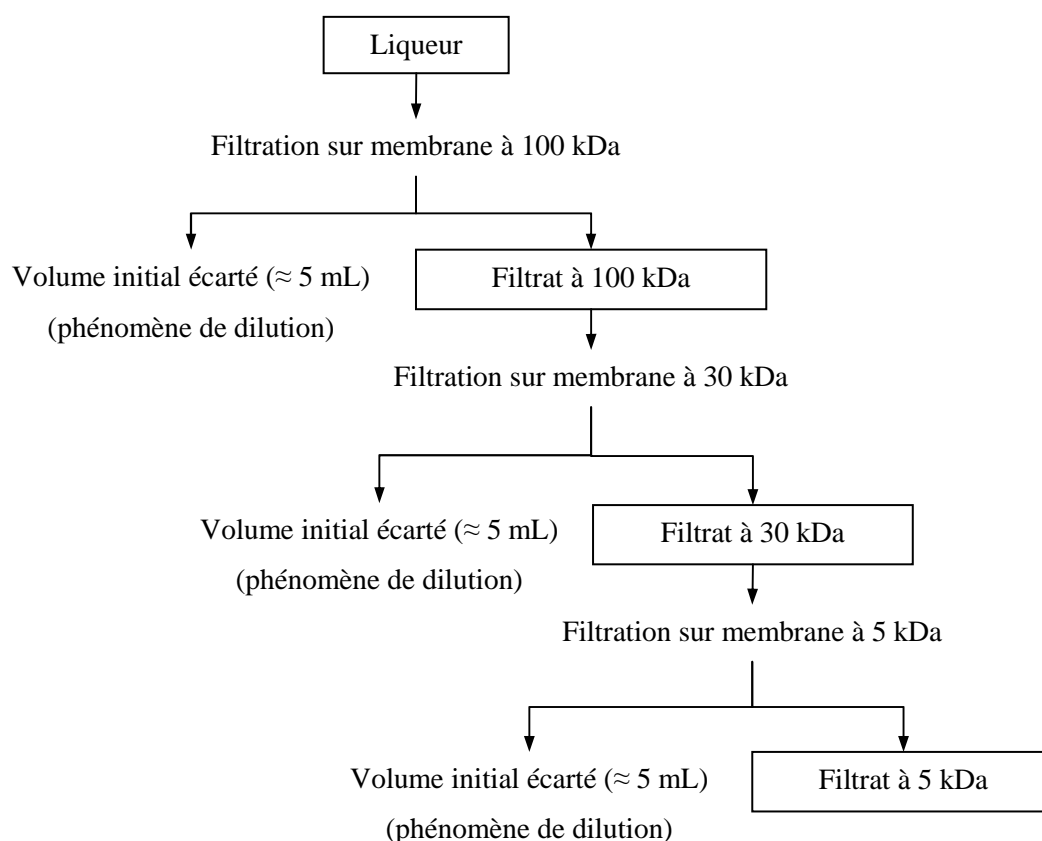


Figure 2.2 : Protocole opératoire pour réaliser l'ultrafiltration des liqueurs

Avant et après chaque utilisation, les membranes sont rincées deux fois avec 80 mL d'eau UP. De plus, l'eau restant dans la cellule après le rinçage a un effet de dilution sur les 5 premiers millilitres prélevés. Par conséquent, lors des analyses, ces 5 premiers millilitres sont écartés. Après utilisation, chaque membrane est régénérée dans une solution de soude à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. La méthode de régénération proposée par le fabricant est de placer chaque membrane dans une solution de soude à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pendant 30 min. Or, les composés libérés lors de la régénération ont tendance à se redéposer sur la membrane en 30 min. C'est pourquoi, nous avons préféré placer, successivement durant 10 min, chaque membrane dans trois béchers contenant la solution de soude à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. La membrane est ensuite rincée à l'aide d'eau UP avant d'être stockée au réfrigérateur dans un mélange eau UP-éthanol absolu (90 %/10 %, v/v).

2.2.2. Minéralisation

Les minéralisations ont été réalisées au sein du Laboratoire de Chimie Analytique et Bio Inorganique (LCABIE) à Pau à l'aide d'un appareil *Multiwave 3000* (Anton Paar). La procédure utilisée a été optimisée au préalable au sein du LCABIE pour les végétaux. Environ 0,3 g de feuilles séchées de thé ou environ 10 g de liqueur sont pesés avec précision et introduits dans un matras en téflon. Deux milieux de minéralisations ont été utilisés :

- 3 mL de HNO_3 et 2 mL de H_2O_2 ;
- 3 mL de HNO_3 , 2 mL de H_2O_2 et 1 mL de HF.

Les réacteurs sont fermés puis placés dans le four à micro-ondes et chauffés de 20°C à 200°C en 20 min suivi d'un palier à 200°C durant 15 min avant le refroidissement à température ambiante. La pression à l'intérieur des matras évolue de 2 à environ 35 bars durant le processus. Les blancs sont préparés selon la même procédure sans ajout de feuilles ni de liqueur. Entre chaque analyse, les matras sont nettoyés avec 7 mL de HNO_3 suivant le même programme de température.

2.3. Méthodes d'analyses

2.3.1. Caractérisation des feuilles de thé

2.3.1.1. Taille des feuilles

La taille des feuilles a été évaluée à l'aide d'un scanner (Epson, Perfection 3200 photo) et du logiciel d'analyse d'image Powershape 4.3 (Innovative Sintering Technologies).

Les feuilles sont disposées manuellement sur une plaque de verre, elle-même déposée sur la vitre du scanner, pour obtenir une image haute résolution dont une partie est reportée dans la Figure 2.3. Par la suite, l'image est traitée à l'aide du logiciel en utilisant différents paramètres que sont le diamètre, le facteur de forme, le rapport de Feret et la convexité. Les particules considérées pour le calcul apparaissent colorées. La manipulation est réalisée trois fois pour chaque thé.

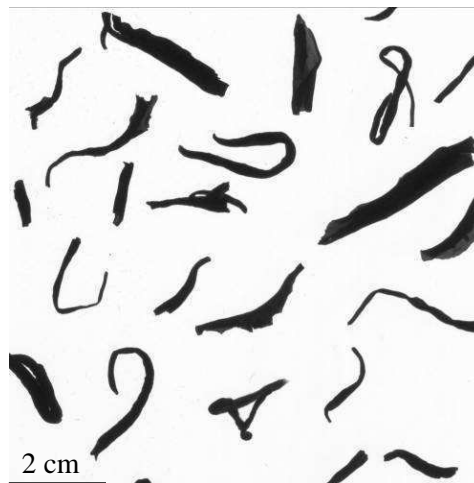


Figure 2.3 : Feuilles de thé M2 scannées pour la mesure de leur taille

Le facteur de forme est le rapport entre le périmètre de l'objet et le périmètre du cercle de surface équivalente. Le rapport de Feret est défini par la relation 2.1 :

$$\text{rapport de Feret} = \frac{D_{\max}}{D_{\min}} \quad \text{Eq. 2.1}$$

où D_{\max} est la distance maximale entre deux lignes parallèles coupant l'objet ;

D_{\min} est la distance minimale entre deux lignes parallèles coupant l'objet (Figure 2.4).

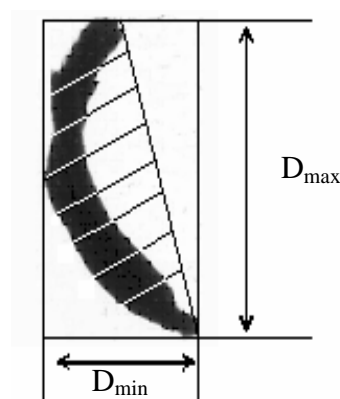


Figure 2.4 : Définition de D_{\max} et D_{\min} dans le cas d'une feuille de thé pour le calcul du rapport de Feret

La convexité est définie par la surface remplie par l'objet (partie noire dans la Figure 2.4) et la surface convexe l'enveloppant (partie hachurée).

Les valeurs des différents paramètres déterminées pour les différentes feuilles de thés étudiées après optimisation sont :

- $100 \leq \text{diamètre} \leq 100\,000\ \mu\text{m}$;
- $1 \leq \text{facteur de forme} \leq 10\,000$;
- $0 \leq \text{rapport de Feret} \leq 1$;
- $0 \leq \text{convexité} \leq 1$.

2.3.1.2. Loupe binoculaire

Les feuilles de thé ont été observées à l'aide d'une loupe binoculaire Nikon SMZ 1500 équipée d'une caméra numérique Nikon DMX 1200. L'ensemble est piloté par un ordinateur permettant d'enregistrer les données. Le logiciel Lucia G. version 5.3 permet de mémoriser et traiter les photographies des observations.

2.3.1.3. Humidité relative

Une masse d'environ 2 g de feuilles sèches non infusées est placée dans une coupelle en verre préalablement tarée puis pesée avec précision. Les échantillons sont ensuite introduits dans une étuve ventilée à 103 °C pendant 24 h. Dès la sortie de l'étuve, les coupelles sont placées dans un dessiccateur le temps de leur refroidissement. Après 30 min, les échantillons sont à nouveau pesés. Trois mesures ont été effectuées pour chaque type de thé. Le calcul de la teneur en eau est basé sur la relation suivante :

$$H_r (\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad \text{Eq. 2.2}$$

avec m_i : masse initiale ; m_f : masse finale.

2.3.1.4. Surface spécifique

Les mesures de la surface spécifique ont été sous-traitées au Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (CIRIMAT, UMR 5085 CNRS-UPS-INPT). L'appareil utilisé est un Flowsorb II 2300 (Micromeritics).

Deux tests de dégazage sont effectués avec N_2 à 100 °C pendant 3 et 6 h. Les mesures sont réalisées avec un mélange de gaz composé de 30 % N_2 et 70 % He dans N_2 liquide lors de la désorption à 77 K (-196°C).

2.3.1.5. Isotherme d'adsorption de vapeur d'eau

L'adsorption isotherme de vapeur d'eau a été réalisée automatiquement à l'aide d'une balance isolée dans une enceinte thermostatée, l'appareillage étant un *Dynamic Vapor Sorption Advantage 1* (Surface Measurement System). Les échantillons sont déshydratés à l'étuve à 103 °C au préalable. La masse de feuilles initialement placée dans l'appareil (m_i) est de l'ordre de la dizaine de mg. La variation de masse est ensuite mesurée à l'aide d'une balance de Cahn d'une précision de 0,05 µg. La séquence de mesure est divisée en deux étapes :

- un préchauffage : 5 min à 25 °C et 0 % H_r (humidité relative) suivi d'une montée en température jusqu'à 103 °C en 5 min suivi d'un palier à 103 °C et 0 % H_r pendant 300 min pour déshydrater totalement l'échantillon ;
- des mesures d'adsorption isotherme durant six paliers d'humidité relative de 0 % à 90 % à 25 °C. Deux conditions contrôlent le changement de palier :
 - soit $dm/dt \leq 5.10^{-4}$ (% de m_i par minute) pendant au moins 5 min ;
 - soit après 12 h à une même H_r .

La forme des isothermes varie suivant le type d'interactions entre le sorbant et le composé sorbé.

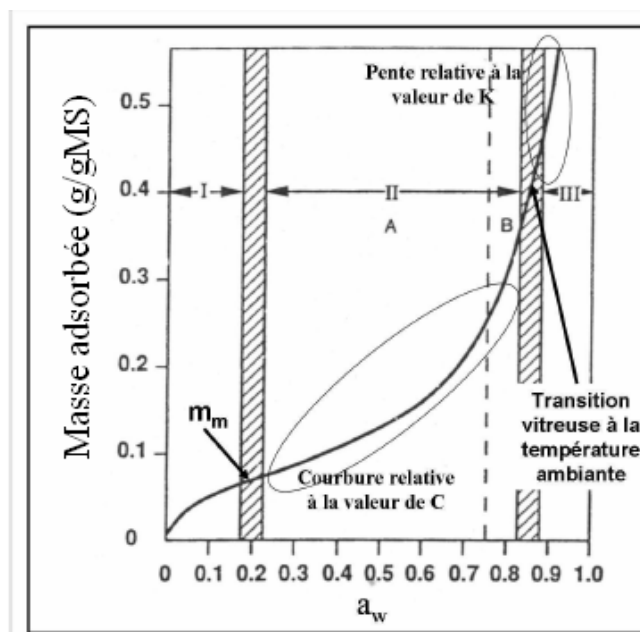


Figure 2.5 : Isotherme d'adsorption généralisée d'eau à l'équilibre, masse d'eau adsorbée vs. activité de l'eau, a_w , pour des matières végétales (Fenema, 1996). Zone I : eau fortement liée aux groupes ioniques ou polaires accessibles. Zone de transition entre les zones I et II : eau adsorbée formant une monocouche sur les groupements fortement polaires accessibles ; ici, il s'agit de la monocouche BET, l'eau commençant à engendrer des changements physico-chimiques en s'associant par des liaisons hydrogène aux molécules d'eau de la monocouche, condensation possible de l'eau. Zone III : eau adsorbée libre, disponible comme solvant, son activité étant alors suffisante

Dans la Figure 2.5 est représenté un exemple d'isotherme de forme sigmoïdale classiquement obtenue. En fonction de l'activité de l'eau à l'équilibre, a_w . Les mécanismes de sorption et les interactions diffèrent : l'eau peut être fortement liée aux groupes ioniques ou polaires avant de former une monocouche sur les groupements fortement polaires accessibles. Lorsque l'activité de l'eau est suffisamment élevée, *i.e.* $> 0,9$, l'eau adsorbée est libre, disponible comme solvant, favorisant ainsi le développement de micro-organismes.

2.3.1.6. Analyse élémentaire

Les analyses ont été sous-traitées au Laboratoire de Contrôle au sein de l'ENSIACET et réalisées sur les feuilles séchées à l'étuve à 40 °C puis broyées à l'aide d'un mortier et d'un pilon en agathe. Les analyses élémentaires en carbone, C, hydrogène, H, et azote, N, ont été effectuées à l'aide d'un appareil EA1112 Flash Series (ThermoFinnigan). Environ 1 mg d'échantillon est pesé sur une balance de précision dans une capsule en étain. Une combustion éclair (1800 °C) par apport d'oxygène est réalisée au sein du tube à combustion, suivie de réactions d'oxydoréduction afin d'obtenir les éléments sous forme de CO₂, de H₂O et de N₂ gazeux. Ces gaz sont ensuite analysés par chromatographie sur une colonne remplie de PTFE (téflon), 2 m, 6×5 mm avec détection par catharomètre. Le gaz vecteur est de l'hélium BIP (hélium de haute pureté avec un purificateur intégré à la bouteille - Air Liquide).

Les analyses d'oxygène, O, ont été réalisées à l'aide d'un appareil EA1110 (CEInstrument). L'échantillon est pesé dans une capsule en argent avant d'être introduit dans l'appareil et brûlé par pyrolyse. Le dioxygène libéré est analysé par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne remplie SS (stainless steel), 1 m, 6×5 mm en milieu Helium.

Dans les deux cas, les appareils sont étalonnés par étalonnage externe à l'aide de produits certifiés (sulfamilamide pour C, H, N et cyclohexanone pour O). Le contrôle est réalisé à l'aide d'échantillons de méthionine (C, H, N) et d'acide benzoïque ou de 2,5-Bis(5tert-butyl-2-benzo-oxal-2-yl)thiophen (BBOT) (O).

2.3.2. Caractérisation des échantillons

2.3.2.1. Paramètres physico-chimiques

2.3.2.1.1. pH, conductivité et masse volumique

Les mesures de pH et de conductivité sont effectuées, après refroidissement des liqueurs à température ambiante (20 à 25 °C), à l'aide d'un pH-mètre 330 (WTW) équipé d'une

électrode S7 (Fisherbrand), d'un conductimètre 330i/SET (WTW) et d'une sonde TetraCon[®] 325 (WTW), respectivement. Les deux appareils sont préalablement étalonnés à l'aide de solutions tampons à pH 4,01 et 7,01 (Bioblock) et d'une solution de KCl à 0,1 mol L⁻¹ (WTW). L'électrode de pH et la sonde du conductimètre sont rincées à l'eau UP entre chaque mesure. Pour ces deux grandeurs, la mesure est effectuée en triplicat.

La masse volumique des liqueurs est mesurée à l'aide d'un densimètre Da-110 (Kyoto Electronics Manufacturing) étalonné avec l'eau UP.

2.3.2.1.2. Dosage des composés minéraux

Le dosage des composés inorganiques a été réalisé à l'aide de deux techniques utilisées au sein du LCABIE : la photométrie de flamme pour le sodium et le potassium, et la spectrophotométrie d'émission atomique à plasma induit (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, ICP-AES) pour l'aluminium, le calcium, le cuivre, le fer, le magnésium, le manganèse et le zinc.

Dosage du sodium et du potassium

Le photomètre de flamme utilisé est un 410 (Corning). Les longueurs d'onde choisies sont 589 nm pour le sodium et 767 nm pour le potassium. L'appareil comporte deux filtres indépendants, obligeant à une analyse pour chaque élément. Les analyses sont effectuées après étalonnage de l'appareil à l'aide de solutions obtenues par dilution d'une solution mère à 0,2 mol L⁻¹ en sodium et d'une solution à 0,1 mol L⁻¹ pour le potassium. Les gammes de concentration s'échelonnent entre 0,25 et 4,0 mmol L⁻¹ pour le sodium et entre 0,05 et 1,0 mmol L⁻¹ pour le potassium. Ces dilutions sont réalisées par pesée à l'aide d'une balance de précision et de micro pipettes.

Dosage de l'aluminium, du calcium, du cuivre, du fer, du magnésium, du manganèse et du zinc

Le spectrophotomètre d'émission atomique à plasma induit est un modèle *Panorama* (Jobin-Yvon) permettant une analyse multi-élémentaire.

Les analyses sont réalisées en utilisant une chambre cyclonique pour les minéralisations en absence de HF ou pour celles avec HF mais pouvant être diluées par 10. Dans les cas contraires, une chambre en téflon est utilisée. Les paramètres d'analyse, après optimisation de l'appareil à l'aide d'une solution de plomb à 5 mg L⁻¹ et les longueurs d'onde d'analyse

utilisées sont reportées dans le Tableau 2.5.

L'étalonnage de l'appareil est réalisé à l'aide de solutions préparées à partir de dilutions de solutions multi-élémentaires commerciales (Tableau 2.3) pour obtenir une gamme d'étalonnage comprise entre 0,5 et 10 mg L⁻¹ pour tous les éléments.

Tableau 2.5 : Longueurs d'onde et paramètres expérimentaux utilisés pour les analyses élémentaires par ICP-AES

Paramètres	Éléments						
	Al	Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Zn
λ (nm)	308,215	317,933	324,754	259,940	279,553	257,610	213,856
Puissance	1000 W						
gaz plasmagène (argon)	15 L min ⁻¹						
gaz de nébulisation	0,1 L min ⁻¹						
débit échantillon	1,0 mL min ⁻¹						

2.3.2.1.3. Dosage des anions majeurs

Les anions majeurs ont été analysés à l'aide d'un chromatographe composé d'une pompe, d'une pré-colonne AG18 (Dionex) et d'une colonne analytique AS18, amine quaternaire 4 x 250 mm, (Dionex) et d'un détecteur conductimétrique (ICS-2000 (Dionex)). Cet appareil est équipé d'un suppresseur chimique AMMs III (Dionex). Le débit d'éluant est de 1 mL min⁻¹. Le gradient utilisé est représenté dans la Figure 2.6.

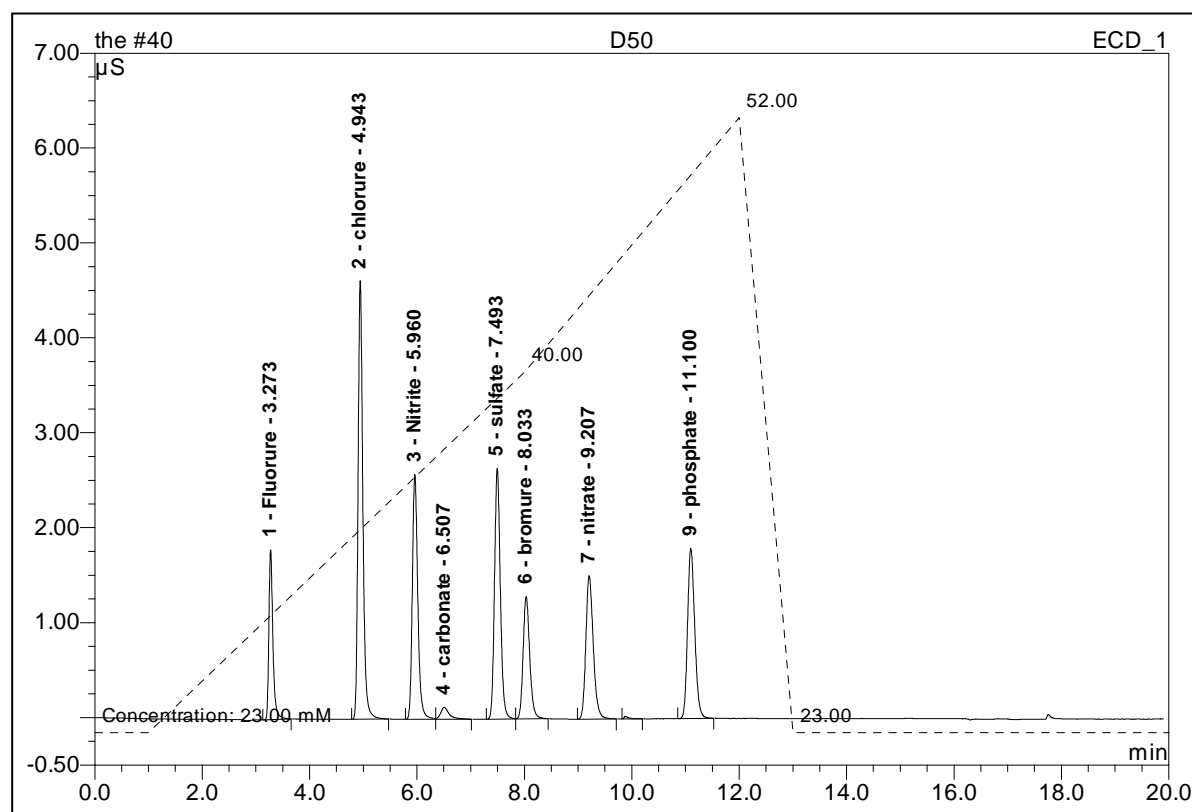


Figure 2.6 : Analyse des anions par chromatographie : Gradient d'élution et chromatogramme obtenu pour la dilution par 50 de la solution-mère contenant les sept anions

Le volume injecté est de 25 μL . L'étalonnage de l'appareil est réalisé à l'aide de solutions préparées par dilution d'une solution-mère contenant sept anions aux concentrations suivantes (Dionex) :

- F^- : 10 mg L^{-1} ;
- Cl^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , Br^- , NO_3^- : 100 mg L^{-1} ;
- PO_4^{3-} : 200 mg L^{-1} .

La gamme d'étalonnage varie entre 0,2 et 2 mg L^{-1} pour le fluor, entre 2 et 20 mg L^{-1} pour les sulfates et entre 1 et 10 mg L^{-1} pour les anions restants.

2.3.2.1.4. Détermination de la matière organique

Pour étudier le comportement de la matière organique des liqueurs, la composition de cette dernière a été estimée à plusieurs niveaux de connaissance des composés : (i) le carbone organique total après filtration appelé plus communément carbone organique dissous, (ii) le carbone sous forme de polyphénols totaux, et (iii) différents composés chimiques de la famille des catéchines, des alcaloïdes comme la caféine avec différentes techniques d'analyse.

Dosage du carbone organique dissous (COD)

Les analyses ont été réalisées au sein du LCABIE à l'aide d'un appareil TOC-5000A (Shimadzu). Pour ces mesures, les liqueurs ont été filtrées à 0,45 μm . Le carbone organique dissous est obtenu par le calcul de la différence entre le carbone total (CT) déterminé par la mesure du CO_2 dégagé par combustion de l'échantillon et le carbone inorganique (CI) déterminé par mesure du CO_2 dégagé après acidification de l'échantillon. Cette mesure permet donc également de déterminer la teneur en carbonates et/ou hydrogénocarbonates suivant le pH initial de l'échantillon.

L'appareil est étalonné à partir de solutions préparées par dilution d'une solution contenant 1000 mg L^{-1} de carbone organique obtenue par dissolution d'une masse précise d'environ 1,0622 g d'hydrogénophthalate de potassium dans 500 mL d'eau UP et d'une solution contenant 1000 mg L^{-1} de carbone inorganique préparée par dissolution d'environ 0,3503 g d'hydrogénocarbonate de sodium et de 0,4412 g de carbonate de sodium anhydre dans 500 mL d'eau UP.

Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux (TPC) pour chaque liqueur a été réalisé par la méthode de Folin Ciocalteu (Montreau, 1972). Ce dosage repose sur l'oxydation en milieu basique des fonctions oxydables des polyphénols par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) qui est réduit en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). Les molécules absorbent la lumière, le maximum d'absorption étant observé pour une longueur d'onde de 760 nm. L'étalon de référence choisi est l'acide gallique (AG). Les concentrations dans les échantillons sont donc obtenues en mg équivalent AG L^{-1} (mg eq AG L^{-1}).

Pour l'étalonnage, cinq fioles contenant respectivement 0, 1, 2, 3 et 4 mL d'une solution d'acide gallique à 200 mg L^{-1} sont préparées. Par la suite et pour chaque fiole, le protocole est le suivant :

- 1). ajout de 5 mL de réactif de Folin Ciocalteu (coloration verte),
- 2). ajout de 10 mL d'une solution à 20 % de Na_2CO_3 anhydre (coloration bleue),
- 3). ajustement à 100 mL avec l'eau UP,
- 4). transvasement dans les tubes à hydrolyse,
- 5). chauffage dans le bain-marie pendant 10 min à 70 °C,
- 6). refroidissement dans l'eau froide jusqu'à température ambiante,

7). mesures de l'absorbance à 760 nm.

Dans le cas des échantillons de thé, à la place de la solution d'acide gallique, 0,5 mL de liqueur est introduit dans la fiole avant de subir le protocole détaillé ci-dessus. Pour chaque liqueur, le dosage est réalisé en triplicat. Le blanc est estimé à partir de l'eau UP. Les liqueurs de thé sans réactif n'absorbent pas à cette longueur d'onde.

Analyse HPLC-UV-MS

Les analyses par HPLC-UV-MS pour six polyphénols (AG, C, EC, ECG, EGC, EGCG) et trois alcaloïdes (CAF, TB, TP) (Tableau 2.3) ont été effectuées à l'aide d'une chaîne Dionex composée d'un injecteur et d'un passeur automatiques, d'une pompe, d'un détecteur à barrette de diodes UV-visible (UVD 170/340U) et d'un spectromètre de masse, simple quadripôle, Surveyor MSQ (Thermo Electron Corporation). La colonne est placée dans un compartiment thermostaté *Thermostated Column Compartment* TCC – 100. Les paramètres utilisés lors de cette étude ont été déterminés après optimisation des données issues de la littérature et sont présentés dans le Tableau 2.6.

Tableau 2.6 : Paramètres utilisés lors des analyses par HPLC-UV-MS

	Paramètre	Détails
HPLC	Colonne (Varian)	apolaire, Omnispher®, C18, Sainless Steel, 100 x 3,0 mm, diamètre des particules 3 µm précédée d'une pré-colonne (10 x 2 mm) directement en tête de colonne (procédé ChromSep®)
	Température (°C)	30°C
	Débit	0,4 mL min ⁻¹ (notice Varian)
	Éluant	solvant A : Eau + 0,5 % acide acétique solvant B : méthanol et acétonitrile à 60 / 40 (v/v, %) + 0,5 % d'acide acétique
	Volume d'injection	10 µL
	λ (nm)	210 et 273 nm
	Capillaire	mode positif
MS	d'ionisation	tension = 3 kV T °C = 450 °C (température conseillée par le constructeur)

Le gradient d'élution retenu est :

- pendant 10 min : équilibre à 95 % A puis ;
- 0 à 25 min : rampe de 95 à 70 % A ;
- 25 à 38 min : rampe de 70 à 0 % A ;
- 38 à 48 min : 0 % A.

Avant chaque analyse, le relarguage éventuel de composés par la colonne est contrôlé par percolation de l'éluant seul suivant le gradient.

L'acquisition des spectres en masse est réalisée en mode TIC (Total Ion Current) et en mode SIM (Single Ion Monitoring) étalonné pour m/z variant entre 172,8840 et 1971,6149 (Tableau 2.7).

Tableau 2.7 : Pics de masse correspondants acquis en mode SIM et temps de rétention moyens pour les composés lors des acquisitions

	pics en mode SIM (m/z)	temps de rétention (min)
AG	-	3,7
TB	-	7,5
TP	-	10,3
EGC	139	11,6
C	291	12,3
	139	
Caféine	195	14,5
	139	
EGCG	459	16,6
	139	
EC	291	17,4
	139	
ECG	443	23,2

La quantification des analyses est réalisée par étalonnage externe. La solution étalon est préparée par pesées précises de chaque composé dans un flacon puis dissolution dans un mélange 60/40 (v/v, %) d'eau UP et de méthanol. Les masses à peser ont été déterminées afin d'obtenir des concentrations dans le mélange final de l'ordre de : $[AG] = 150 \text{ mg L}^{-1}$, $[TB] = 160 \text{ mg L}^{-1}$, $[TP] = 170 \text{ mg L}^{-1}$, $[EGC] = 65 \text{ mg L}^{-1}$, $[C] = 70 \text{ mg L}^{-1}$, $[caféine] = 160 \text{ mg L}^{-1}$, $[EGCG] = 85 \text{ mg L}^{-1}$, $[EC] = 110 \text{ mg L}^{-1}$ et $[ECG] = 80 \text{ mg L}^{-1}$.

Les dilutions ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$) dans un mélange 60/40 (v/v, %) eau UP/méthanol sont préparées par pesées. L'étalonnage est effectué journalièrement. Entre les analyses, la solution-étalon est conservée au réfrigérateur pour limiter la dégradation des composés.

Limites de détection, de quantification et incertitudes

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont définies comme étant respectivement « la plus petite concentration pouvant être détectée, mais non quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode » et « la plus petite concentration de

l'analyte pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode » (Norme FD V 01-000). Elles ont été calculées à l'aide des relations suivantes (IUPAC, 1987) :

$$LD = \frac{3 \sigma}{k}$$

$$LQ = \frac{10 \sigma}{k}$$
Eq. 2.3

où a_0 est l'ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage ;

k est la pente de cette droite ;

σ est l'écart type du signal du blanc.

Les valeurs de LD et LQ sont obtenues à partir de l'analyse d'un minimum de 10 blancs à l'exception de la photométrie de flamme. En effet, pour cette dernière technique, la valeur du blanc est toujours zéro, le signal donné par l'appareil variant entre 0 et 90 pour Na et entre 0 et 400 pour K par pas de un. La LD est considérée comme correspondante à une unité de signal soit $0,34 \text{ mg L}^{-1}$ pour Na et $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ pour K et d'après la définition, la LQ correspond à trois fois la LD soit 1 mg L^{-1} pour Na et $0,56 \text{ mg L}^{-1}$ pour K.

Les valeurs concernant les analyses minérales à l'aide d'une chambre cyclonique en quartz, celles pour la chambre en téflon et les valeurs pour les analyses de matière organique sont reportées dans les Tableaux 2.8, 2.9 et 2.10, respectivement.

Tableau 2.8 : Limite de détection et de quantification en chambre cyclonique en quartz

	Al	Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Zn
LD (mg L^{-1})	0,13	0,30	0,01	0,06	0,08	0,03	0,06
LQ (mg L^{-1})	0,34	0,80	0,04	0,1	0,10	0,04	0,1

Tableau 2.9 : Limite de détection et de quantification pour les minéralisats

	Al	Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Zn
LD (mg L^{-1})	0,1	0,1	0,1	0,02	0,03	0,02	0,05
LQ (mg L^{-1})	0,4	0,4	0,2	0,04	0,09	0,04	0,10

Tableau 2.10 : Limite de détection et de quantification pour les analyses organiques

	TPC	CT	CI	AG	TB	TP	EGC	C	CAF	EGCG	EC	ECG
LD (mg L^{-1})	4	0,2	0,5	0,2	0,2	0,1	0,5	0,3	0,1	0,2	0,3	0,2
LQ (mg L^{-1})	13	0,5	0,6	0,66	0,36	0,3	2	1,2	0,5	0,4	1,4	0,7

Les droites d'étalonnage sont reportées en Annexe 2 et 3.

Les incertitudes données sont obtenues en calculant l'écart-type lorsque six valeurs au-moins sont mesurées. Dans les autres cas, trois mesures au-minimum sont réalisées pour calculer la moyenne ainsi que les valeurs maximales et minimales.

Dans le cadre de l'analyse élémentaire, les résultats sont fournis par le laboratoire de contrôle après analyse répliquée des étalons (Tableau 2.11).

Tableau 2.11 : Limites de détection (LD) et de quantification (LQ), et erreur relative (% massique) pour l'analyse élémentaire

	LD (% m _i)	LQ (% m _i)	Erreur relative (%)
C	0,6	1,8	0,3
H	0,3	0,9	0,3
N	0,5	1,5	0,3
O	0,6	1,8	0,5

2.3.2.2. Résonance magnétique nucléaire

Les analyses RMN ont été réalisées en collaboration avec le groupe de RMN biomédicale dirigé par le professeur Myriam Malet-Martino (Laboratoire de Synthèse et Physicochimie de Molécules d'Intérêt Biologique, LSPCMIB – UMR5068 CNRS-Université Paul Sabatier).

La résonance magnétique nucléaire est une méthode spectroscopique, généralement employée dans les études structurales et les interactions moléculaires. Elle peut être également utilisée dans la mesure de constante de cinétique ou dans le dosage de composé organique.

Le noyau le plus simple à détecter en RMN est l'hydrogène, lié à son abondance naturelle et à sa sensibilité. La majorité des composés organiques et notamment ceux présents dans les liqueurs de thé sont constitués d'un ou plusieurs protons, ^1H . Il sera donc possible, grâce à l'appareillage de spectroscopie RMN et aux séquences d'impulsions, d'obtenir un spectre ^1H de l'ensemble des molécules organiques présentes dans le milieu d'étude. Ce spectre représente la carte d'identification ^1H du mélange analysé.

Il existe dans la littérature de nombreuses séquences d'impulsions RMN qui sont utilisées selon l'information souhaitée (1D, 2D, ...). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux déplacements chimiques des ^1H exprimés en ppm avec des acquisitions monodimensionnelles (1D) ^1H . Les déplacements chimiques dépendent à la fois de la

structure de la molécule organique, mais également de l'environnement dans laquelle elle se trouve.

La présence de H₂O dans les liqueurs de thé est une source de problème en RMN de ¹H, car la concentration en eau est très largement supérieure à celle des autres composés. Pour palier ce handicap, nous avons utilisé une séquence RMN plus complexe : la séquence 1D par *Excitation Sculpting* (ES). Ceci permet la suppression du pic de l'eau sur les spectres, grâce à des impulsions sélectives et ainsi d'analyser les variations de déplacement chimique. Cependant, cette séquence d'impulsion limite la possibilité d'une quantification. Cette dernière a été mise en œuvre après lyophilisation des différentes liqueurs non filtrées et leur reprise dans l'eau lourde (D₂O) avant l'acquisition de spectre 1D ¹H par une simple impulsion de 90° (expérience zg).

Les spectres RMN ¹H ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker AVANCE Ultrashield 500 à 11,7 Tesla, opérant à 500,11 MHz, équipé d'une cryosonde TCI 5mm, muni de gradient sur l'axe z.

Les paramètres de l'expérience 1D *Excitation Sculpting* (1D ES) en milieu 90 % H₂O : 10 % D₂O (v : v) pour la mesure des déplacements chimiques et de l'expérience 1D zg dans 100 % de D₂O pour la quantification sont reportés dans le Tableau 2.12. Une impulsion sélective de type Squa100.1000 de 1000 µs a été utilisée pour supprimer le pic de l'eau durant l'expérience 1D ES.

Tableau 2.12 : Paramètres des acquisitions en RMN (expériences en *excitation sculpting* et en zg)

	Nombre de balayages	Durée d'acquisition (s)	D ₁ (s) ⁽¹⁾	SW (ppm) ⁽²⁾	O1P (ppm) ⁽³⁾	P ₁ (°) ⁽⁴⁾
1D ES	64 à 256	2,72	2	12,0	4,7	90
1D zg	256	2,72	12	12,0	4,7	30

(1) : temps de relaxation

(2) : largeur spectrale

(3) : déplacement chimique de la porteuse

(4) : impulsion

La température d'étude est de 298 K, le TMPS (l'hydrate de sodium de 3-(triméthylsilyl)-1-propanesulfonic acide) dissous dans D₂O a été utilisé comme référence interne et le volume final placé dans le tube RMN de 5 mm est de 550 µl (500 µl de liqueur et 50 µl de référence).

Les expériences par *excitation sculpting* ont été réalisées en triplicat. En ce qui concerne la quantification, deux liqueurs ont été préparées, et pour chacune, deux aliquotes ont été lyophilisées. L'acquisition et le traitement des données sont réalisés à l'aide du logiciel Top Spin versions 1.3 et 2.0 (Bruker).

2.3.2.3. Détermination de la mobilité électrophorétique

Les mesures de mobilité électrophorétique ont été effectuées au Laboratoire de Génie Chimique (LGC – UMR5503 CNRS-UPS-INPT) à l'aide d'un appareil *Zétasizer 4* (Malvern). La mesure du potentiel ζ permet d'évaluer la charge de surface des colloïdes ainsi que leur stabilité. En effet, les particules sont considérées comme stables si leur potentiel est supérieur à +30 mV ou inférieur à -30 mV (Malvern Instruments).

La mobilité électrophorétique pour une particule chargée soumise à un champ électrique est définie par :

$$u_E = \frac{v_{eo}}{E} \quad \text{Eq. 2.4}$$

avec v_{eo} : vitesse maximale de la particule (m s^{-1})

E : champ électrique (V m^{-1}).

L'unité de mobilité la plus couramment utilisée est le $\mu\text{m cm V}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Afin de pouvoir connaître la charge de surface à partir des mesures de mobilités électrophorétiques, certaines hypothèses sont nécessaires (Hunter, 1981) :

- le solide est supposé de forme sphérique ou cylindrique ;
- le liquide est assimilé à un liquide newtonien ;
- les particules sont suffisamment petites pour négliger les forces de gravité ;
- les déplacements sont suffisamment lents pour négliger la turbulence ainsi que les effets non linéaires.

Dans ce modèle, il est nécessaire d'introduire un plan de cisaillement correspondant à une surface imaginaire à l'intérieur de laquelle le liquide entourant la particule migre avec elle. Cette surface est supposée avoir un potentiel électrostatique constant appelé potentiel zêta ζ .

L'équation de Poisson-Boltzman décrit la distribution du potentiel en supposant que :

- les ions sont des charges ponctuelles ;
- le liquide est un milieu continu caractérisé par sa seule permittivité indépendante du champ appliqué ;
- le travail exercé pour déplacer la particule en un point où le potentiel électrostatique est ψ est le travail électrique.

L'intégration de cette équation entre un point éloigné du solide pour lequel $\psi = 0$ et $v = v_{eo}$ et la plan de cisaillement où $\psi = \zeta$ et $v = 0$ et en supposant le liquide figé et le déplacement de la particule inverse conduit à deux équations : équation de Smoluchowski et équation de Hückel. Ces équations se réfèrent à des particules de taille différente. Ainsi le paramètre déterminant

pour choisir l'une ou l'autre est $\kappa.r$ où r est le rayon de la particule et κ le paramètre de Debye-Hückel, $1/\kappa$ représentant l'épaisseur de la double couche.

Pour les valeurs $\kappa.r \gg 1$, l'équation de Smoluchowski s'applique (Hunter, 1981) :

$$u_E = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon \zeta}{\eta} \quad \text{Eq. 2.5}$$

avec ε_0 : permittivité du vide soit $8,84.10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$

ε : constante diélectrique du milieu

ζ : potentiel zêta (V)

η : viscosité dynamique (Pa s).

Dans le cas des $\kappa.r \ll 1$, il faut considérer l'équation de Hückel :

$$u_E = \frac{2 \varepsilon_0 \varepsilon \zeta}{3 \eta} \quad \text{Eq. 2.6}$$

Avant chaque série d'analyse, l'appareil est contrôlé avec une solution étalon (*Zeta potentiel transfer solution*) dont la valeur de potentiel est $(-50 \pm 5) \text{ mV}$ à 25°C . Les mesures sont réalisées dans une cellule thermostatée à 25°C par de l'eau UP.

L'analyse de la variation du potentiel ζ en fonction du pH est réalisée à 25°C à l'aide d'un titrateur DL 21 (Mettler) étalonné au préalable. Le pH est ajusté à l'aide d'une solution d'acide nitrique à $0,76 \text{ mol L}^{-1}$ et d'une solution de soude décarbonatée à $0,76 \text{ mol L}^{-1}$ conservée sous courant d'azote.

Les mesures de potentiel sont réalisées deux fois à l'aide de 90 mL de liqueur :

- ajout d'acide pour atteindre pH 1 puis ajout de soude pour atteindre pH = 12 ;
- ajout de soude pour atteindre pH 12 puis ajout d'acide pour atteindre pH = 1.

Trois mesures de potentiel ont été réalisées sur deux prélèvements différents aux valeurs entières de pH.

2.3.2.4. Observations et analyses au microscope électronique à balayage (MEB-EDS)

L'écume de thé a été observée et analysée par MEB-EDS au Laboratoire des Mécanismes et Transferts en Géologie (LMTG - UMR5563 IRD-CNRS-Université Paul-Sabatier). L'appareil utilisé est un *Scanning Electron Microscope* (Jeol) couplé à un détecteur EDS, *Energy Dispersive Spectrometry* (Princeton Gamma Tech). Le logiciel d'acquisition des données est Spirit (PGT).

Avant analyse, l'échantillon d'écume de thé a été prélevé à l'aide d'une pastille adhésive. La température de l'enceinte est de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ et la pression de 30 Pa car l'échantillon n'a pas été carbonisé auparavant.

2.3.2.5. Analyse sensorielle

Deux études d'analyse sensorielle ont été conduites, l'une portant sur la réalisation d'un profil sensoriel de quatre thés noirs Darjeeling (Am, M8, Nt et Nu) et deux eaux (MR et T). Puis, le thé noir M8 a été choisi pour étudier plus spécifiquement l'influence de la teneur en calcium à l'aide de cinq eaux (MR, Vi et les eaux synthétiques). Dans les deux cas, la préparation des échantillons est identique.

2.3.2.5.1. Préparation des échantillons

La salle d'analyse sensorielle est fermée, en surpression par rapport à l'extérieur et à température constante. Elle comporte quatre cabines individuelles. Les essais analytiques ont été effectués sur papier et les échantillons, présentés en mode monadique (un seul échantillon à la fois), ont été accompagnés systématiquement d'un verre d'eau (Volvic[®]) et d'un biscuit (cracker d'Heudebert[®]) pour atténuer l'astringence en bouche entre chaque produit. Les tests ont été pratiqués en utilisant 18 sets de thé en porcelaine, composés d'un bol de dégustation et d'une verseuse conçue spécialement pour préparer la liqueur et recueillir les feuilles dans le couvercle (Figure 2.7) en conformité avec la norme ISO 3103 (International Organisation for Standardisation, 1981).



Figure 2.7 : Set normalisé utilisé pour l'analyse sensorielle des liqueurs de thé

Les pesées nécessaires aux essais sont réalisées à l'aide d'une balance de précision à 0,1 g. À chaque séance, 2 g de feuilles de thé sont préparés pour 100 mL d'eau (International Organisation for Standardisation, 1981). L'eau est chauffée jusqu'à $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ et la durée d'infusion est de 3 min, conditions préconisées par le fournisseur de thé, la maison Mariage

Frères[®]. Le thé est placé dans chaque set codé à l'aide d'un code à trois chiffres. L'eau chauffée est versée directement dans le set jusqu'à environ 4 à 6 mm du bord ce qui correspond à environ 100 mL. Le set est alors donné dans la cabine et sur un plateau au juge. Ce dernier doit attendre 3 min que le chronomètre individuel sonne pour pouvoir verser la liqueur de thé dans le bol en maintenant le couvercle pour retenir les feuilles (Figure 2.8). Il doit alors observer, sentir puis goûter la liqueur.



Figure 2.8 : Utilisation d'un set lors de l'analyse sensorielle des liqueurs de thé

2.3.2.5.2. Juges

Treize femmes et quatre hommes, appartenant au panel sensoriel interne du LCA mais novices dans l'évaluation sensorielle du thé, constituaient le jury. Il leur a été précisé de ne pas se parfumer le jour de l'analyse et de s'abstenir pendant au moins une heure précédant la séance de toute prise de nourriture, de tabac et de boissons autres que de l'eau, notamment le café.

2.3.2.5.3. Élaboration du profil sensoriel de quatre thés

L'analyse sensorielle de type Analyse Quantitative Descriptive a été réalisée avec 17 juges qui ont évalué l'intensité de descripteurs, définis au préalable, sur des échelles d'évaluation non structurées. Une première réunion a été organisée dans le but d'informer les juges de l'objectif de l'étude. L'analyse s'est ensuite déroulée en plusieurs phases qui sont la génération et la sélection des descripteurs, l'entraînement à l'aide de références (tests de classement) et de liqueurs de thé puis l'élaboration du profil.

2.3.2.5.4. Profil sensoriel d'un thé avec cinq eaux

Pour cette étude, le thé M8 a été choisi. Les descripteurs utilisés ont été imposés par l'analyste et sont « intensité de la couleur », « odeur globale », « flaveur globale », « acide »,

« astringent » et « amer ». Les juges connaissant déjà les termes utilisés suite à la réalisation du premier profil, aucun entraînement supplémentaire n'a été effectué. Les deux séances de notations se sont déroulées durant une semaine : 5 thés sont présentés en mode monadique de façon aléatoire suivant un plan équilibré mais les réplicats sont obtenus en doublant la séance, *i.e.* les 5 produits sont présentés de façon aléatoire à chaque séance.

2.3.2.5.5. Traitement des données

L'intensité de chaque descripteur est donnée par la distance, en cm, entre l'extrémité gauche de l'échelle et la marque inscrite par le juge. L'échelle mesurant 10 cm, les notes peuvent varier de 0 à 10. Sur les données sensorielles ainsi obtenues, des traitements statistiques ont été effectués :

- l'analyse en composante principale par le logiciel Spad[®] (Spad) qui permet la projection des données ;
- l'analyse de variance, ANOVA, par le logiciel Xstat[®] (Microsoft) afin de déterminer l'effet « juge », l'effet « produit » et les interactions « juges * produits ».

L'ANOVA est souvent suivie d'un test de comparaisons multiples : le test de Newman Keuls. Soit l'hypothèse H_0 : tous les produits sont considérés identiques. La première étape consiste à déterminer la plus petite amplitude significative (PPAS) selon la formule suivante :

$$PPAS = q_{\alpha}(t, \nu) \sqrt{\frac{CMR}{n}}$$

avec - $q_{\alpha}(t, \nu)$ = valeur lue dans la table de Newman-Keuls au niveau de risque $\alpha = 5\%$

- t est le nombre de moyennes ;
- ν est le nombre de degrés de liberté ;
- n est le nombre de répétition ;
- \sqrt{CMR} est l'écart type résiduel.

Si l'amplitude observée est inférieure à PPAS, l'hypothèse H_0 est validée les calculs s'arrêtent sinon il faut considérer un groupe de t-1 moyennes et ainsi de suite pour obtenir la validation de H_0 .

Moyenne géométrique

De plus, différents tests statistiques ont été utilisés pour tester les performances du panel. Tout d'abord, la moyenne géométrique permet d'effectuer les réductions de descripteurs en choisissant les plus significatifs.

Elle est calculée selon la formule suivante (International Organisation for Standardisation, 1994) :

$$M = \sqrt{F \cdot I} \quad (\%) \quad \text{Eq. 2.7}$$

où - $F = \frac{\text{nombre de citation du descripteur}}{\text{nombre total de citation possible}} \quad (\%)$;

- $I = \frac{\text{intensité pour chaque descripteur}}{I_{\max}} \quad (\%)$;

- nombre de citation possible = nombre de juges \times nombre de produits ;

- I_{\max} = intensité maximale de l'échelle \times nombre de produits \times nombre de juges .

Tests non paramétriques : coefficient ρ de Spearman et test de Friedman

Dans le cadre des tests de classement de solutions de référence, une évaluation individuelle des performances de chaque juge et une évaluation plus globale de l'ensemble du panel ont été respectivement réalisées par le calcul du coefficient ρ de Spearman et du test de Friedman.

Ces tests sont tous deux non-paramétriques et reposent sur la corrélation des rangs.

Le coefficient ρ de Spearman est défini par l'équation 2.8 (Boursin, 1981) :

$$\rho_{\text{spearman}} = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^n d_i^2}{N^3 - N} \quad \text{Eq. 2.8}$$

où $d_i = (X_i - X_0)$ avec X_i le rang donné par le juge et X_0 le rang théorique. N représente le nombre de solutions à classer. Il permet d'établir s'il existe une corrélation entre le classement donné par le juge et le classement théorique. Plus ρ est proche de 1, plus le juge est en accord avec le classement théorique. La valeur ρ , définie dans l'équation 2.8, est comparée aux valeurs critiques de ρ_{Spearman} données dans les tables de Spearman pour déterminer si l'ordre est retrouvé au risque choisi (α). Dans notre étude, le risque est de 5 %.

Le test de Friedman permet de savoir s'il existe une différence entre au moins deux produits. Pour cela, nous posons H_0 : Tous les produits sont considérés comme identiques soit $p_1 = p_2 = \dots = p_i$.

La valeur de F est obtenue selon l'équation 2.9 :

$$F = \chi^2_{obs} = \frac{12}{N k (k+1)} \sum_{i=1}^n R_i^2 - 3 N (k+1) \quad \text{Eq. 2.9}$$

où

- N est le nombre de juges ;
- k est le nombre de produits ;
- R_i est la somme des rangs affectés au produit i.

Si $\chi^2_{obs} > \chi_\alpha$ à (k-1) degré de liberté avec χ_α lu dans la table de χ^2 alors H_0 est rejetée et les produits sont différents. Dans ce cas là, la différence $D_{i-i+1} = R_{i+1}^2 - R_i^2$ est jugée significative si elle est supérieure à la plus petite valeur significative donnée par l'équation 2.10 :

$$\delta = t_{\alpha/2, \infty} \sqrt{\frac{3 N (k+1)}{6}} \quad \text{Eq. 2.10}$$

où $t_{\alpha/2, \infty} = 1,96$ soit la valeur du t de Student à $\alpha = 5 \%$ pour un degré de liberté infini.

Si $D_{i-i+1} \geq \delta$, les deux produits sont perçus comme différents et appartiennent à deux groupes différents.

CHAPITRE 3

COMPOSITION DES FEUILLES ET DES LIQUEURS DE THÉ

CHAPITRE 3. COMPOSITION DES FEUILLES ET DES LIQUEURS DE THÉ	75
3.1. LES FEUILLES DE THÉ	75
3.1.1. <i>Effet du traitement</i>	75
3.1.1.1. Humidité relative des feuilles	75
3.1.1.2. Taille des feuilles	76
3.1.1.3. <i>Propriétés de surface</i>	77
3.1.2. <i>Composition des feuilles de thé</i>	79
3.2. LES LIQUEURS DE THÉ	82
3.2.1. <i>Caractérisation des eaux</i>	82
3.2.1.1. Eaux minérales naturelles	82
3.2.1.2. Eaux synthétiques	85
3.2.2. <i>Préparation des liqueurs de thé</i>	87
3.2.2.1. Influence du traitement subi par les feuilles sur la réhydratation durant l'infusion	87
3.2.2.2. Volume de liqueur obtenue	87
3.2.2.3. Effet de la durée entre la réalisation de la liqueur et le temps d'analyse	88
3.2.2.4. Reproductibilité des liqueurs	89
3.2.2.5. Effet de la température	90
3.2.3. <i>Influence de la nature du thé sur les propriétés physico-chimiques des liqueurs de thé</i>	90
3.2.3.1. pH des liqueurs	91
3.2.3.2. Extraction des éléments minéraux	91
3.2.4. <i>Influence de la nature de l'eau : Eaux minérales naturelles</i>	93
3.2.4.1. pH des liqueurs	93
3.2.4.2. Formation de l'écume de thé	94
3.2.4.3. Extraction de la matière organique	97
3.2.4.4. Extraction de la matière minérale	98
3.2.5. <i>Influence de la nature de l'eau : Eaux synthétiques</i>	103
3.2.5.1. pH et conductivité des liqueurs	103
3.2.5.2. Extraction de la matière organique	104
3.2.5.2.1. Carbone organique dissous et polyphénols totaux	104
3.2.5.2.2. Analyse des catéchines et de la caféine	106
3.2.5.3. Extraction de la matière minérale	109
3.2.5.4. Formation de colloïdes	110
3.2.5.4.1. Charge des colloïdes	110
3.2.5.4.2. Interaction entre les molécules organiques	120

Chapitre 3. Composition des feuilles et des liqueurs de thé

L'objectif de cette partie du travail a été de caractériser la taille, la structure et les capacités d'adsorption d'eau des différentes feuilles de thé ainsi que d'évaluer l'influence de la composition physico-chimique de l'eau utilisée sur l'extraction des différents composés qu'ils soient organiques ou minéraux. Dans un premier temps, cette étude a été conduite à l'aide de l'eau UP du laboratoire ainsi que de trois eaux minérales naturelles. Par la suite et dans le but de mieux maîtriser les différents paramètres que sont le pH, la force ionique et la teneur en calcium, nous avons ajouté différents sels de calcium à une eau de référence, ces eaux enrichies en calcium seront désignées sous le nom « d'eaux synthétiques » par la suite.

3.1. Les feuilles de thé

3.1.1. Effet du traitement

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1 (cf. 1.1.3), les deux principaux procédés de manufacture du thé sont les traitements CTC et orthodoxe. Ci-après, nous nous intéresserons à l'influence de ces procédés sur les caractéristiques des feuilles examinées.

3.1.1.1. Humidité relative des feuilles

L'humidité relative, HR, a été déterminée pour les différents types de thés, suivant le protocole décrit dans le paragraphe 2.3.1.3 (Tableau 3.1). Elle varie entre 6,8 et 8,4 %.

Tableau 3.1 : Humidité relative (%) des feuilles de thé

Feuilles	HR (%)
LS	$8,4 \pm 0,3$
LC	$8,43 \pm 0,04$
M6	$7,9 \pm 0,2$
M8	$6,8 \pm 0,2$
M2	$7,9 \pm 0,3$
M5	$7,4 \pm 0,3$

Les thés broyés sont légèrement plus humides que les thés en feuilles entières bien que pour les thés M6 et M2, la différence soit à la limite de la significativité. Par ailleurs, les thés verts ne semblent pas avoir de valeurs significativement différentes comparés aux thés noirs. Les valeurs des humidités relatives analysées sont supérieures à celles obtenues en fin de procédé

de manufacture qui sont normalement inférieur à 5 % (1.1.3). Ces différences peuvent être dues à une modification de l'activité de l'eau dans les feuilles au cours du stockage (Chen *et al.*, 1993).

3.1.1.2. Taille des feuilles

La taille des feuilles est un paramètre important pour les phénomènes d'échanges lors de l'extraction. En effet, les échanges aux interfaces sont souvent considérés comme facilités par une diminution de taille qui entraîne une augmentation de la surface d'échange. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un scanner assisté du logiciel Powdershape (cf. paragraphe 2.3.1.1). La moyenne, la médiane et le coefficient d'asymétrie ont été estimés à partir trois réplicats à partir de l'utilitaire d'analyse « statistiques descriptives » du logiciel Excel® (Microsoft) (Tableau 3.2). Les coefficients d'asymétrie sont calculés à l'aide d'un estimateur sans biais en utilisant l'équation 3.1 :

$$A = \frac{N}{(N-1)(N-2)} \sum_{i=1}^{i=N} \left(\frac{x_i - \bar{x}}{\sigma} \right)^3 \quad \text{Eq. 3.1}$$

avec N : le nombre de valeurs ;
 x_i : la taille de chaque particule ;
 \bar{x} : la taille moyenne ;
 σ : l'écart type des valeurs.

Tableau 3.2 : Taille (µm) des différentes feuilles de thé mesurée par analyse d'image

	Longueur			Largeur		
	Moyenne (µm)	Médiane (µm)	Asymétrie	Moyenne (µm)	Médiane (µm)	Asymétrie
LS	805	639	1,7	469	402	1,0
LC	1431	1410	0,5	814	832	0,3
M6	4647	4522	0,5	1666	1649	0,8
M8	5251	4794	0,52	2056	1931	0,6
M2	6966	7200	0,3	2006	2041	0,4
M5	5146	4124	1,2	1770	1550	1,1
M5B	496	372	2,2	187	99	2,5

Pour les thés LC, M6, M8 et M2, les valeurs moyennes de taille des feuilles sont proches des valeurs médianes ce qui indique que les distributions sont quasiment symétriques. Ceci indique que les distributions sont quasiment symétriques. Cela est confirmé par des valeurs du coefficient d'asymétrie proches de zéro. Dans le cas des thés LS, M5 et M5B, les distributions sont plus dissymétriques avec plus de feuilles dont la taille est inférieure à la médiane. Ces mesures montrent que la taille des feuilles de thé pour ces thés est moins homogène que celle des autres feuilles.

En général, les feuilles entières sont 3 à 9 fois plus longues que les feuilles broyées (thés LS et LC). Le broyage manuel des feuilles M5 conduit à des particules 10 fois plus petites que les feuilles initiales. De plus, ce broyage est moins homogène que le broyage mécanique et entraîne un aspect filamenteux non observé avec le broyage mécanique (Figure 3.1).

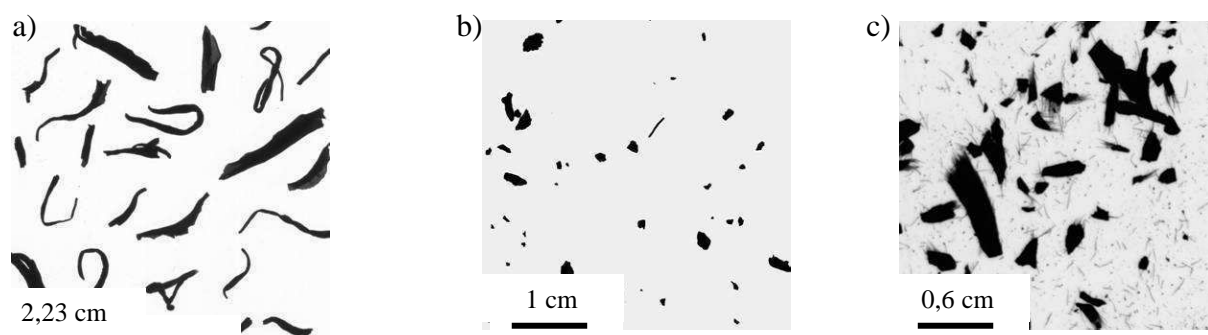


Figure 3.1 : Images permettant d'estimer la taille des feuilles des thés : a) vert M2, b) noir LS ayant subi un broyage mécanique et c) vert M5 B ayant subi un broyage manuel

3.1.1.3. Propriétés de surface

Outre la taille des particules, les propriétés d'adsorption de gaz comme N_2 et H_2O (g) ont permis également de caractériser les possibilités d'échanges aux interfaces entre les feuilles de thé et l'eau durant l'infusion. Les mesures de la surface spécifique des feuilles, par la méthode BET, N_2 77 K, ont été effectuées après un dégazage durant 3 h et 6 h. Dans les deux cas, les valeurs obtenues sont les mêmes et ne sont pas significativement différentes d'un type de thé à l'autre (Tableau 3.3).

Tableau 3.3 : Surfaces spécifiques ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) des feuilles de thé (méthode BET, N_2 77 K)

Feuilles	Surface spécifique ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)
LS	$0,30 \pm 0,05$
LC	$0,30 \pm 0,05$
M6	$0,40 \pm 0,05$
M8	$0,40 \pm 0,05$
M2	$0,20 \pm 0,05$
M5	$0,30 \pm 0,05$
M5 B	$0,30 \pm 0,05$

Les surfaces spécifiques sont particulièrement faibles par comparaison avec celles de matériaux à double porosité comme les charbons actifs, pour lesquels les valeurs peuvent atteindre $1\,000 \text{ m}^2 \text{g}^{-1}$ (Sigg *et al.*, 2000). Ces résultats montrent que les feuilles de thé ne possèdent pas une structure poreuse accessible à l'azote qu'elles soient broyées ou non. L'utilisation d'un autre gaz tel que le xénon à des températures plus élevées, 298 K, pourrait permettre de vérifier cette hypothèse.

Pour compléter ce travail, des isothermes d'adsorption d'eau sur les feuilles de deux thés noirs, LS et M8, et un thé vert, M5, ont été réalisées (Figure 3.2) à l'aide d'un appareil DVS (cf. 2.3.1.5). Les résultats obtenus montrent que le comportement de l'eau diffère par rapport à celui de l'azote quant à sa sorption sur les différents types de feuilles.

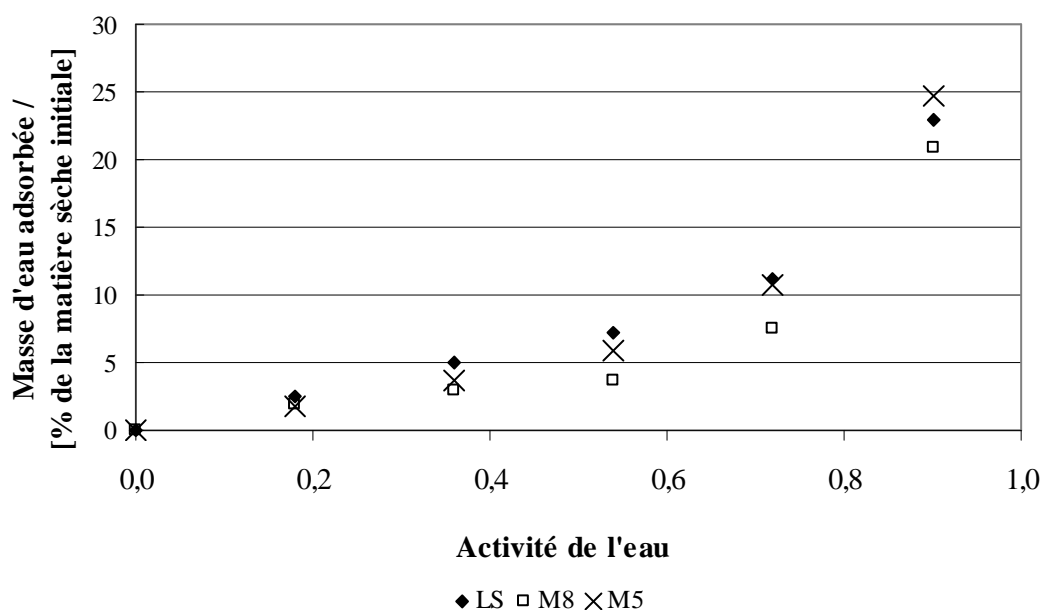


Figure 3.2 : Isothermes d'adsorption d'eau en fonction de son activité pour deux thés noirs avec des feuilles entières (M8) et des feuilles broyées mécaniquement (LS) et un thé vert avec des feuilles entières (M5). Les masses de thé sont 27,24 mg pour M8, 28,79 mg pour LS et 14,82 mg pour M5.

Globalement, les trois thés se comportent différemment, le thé LS broyé mécaniquement ayant une affinité pour l'eau supérieure pour une activité de l'eau inférieure à 0,7. Pour une activité de l'eau inférieure à 0,3, les deux thés à feuilles entières, M5 et M8, possèdent une réactivité vis-à-vis de l'eau comparable. Pour des valeurs d'activité supérieures à 0,3, le thé M8, dont l'humidité relative des feuilles est la plus faible (Tableau 3.1), semble avoir moins d'affinité pour l'eau. Pour une activité de l'eau comprise entre 0 et 0,25, la monocouche d'hydratation est formée plus facilement pour le thé broyé par rapport aux deux autres (Fenema, 1996). Cela indiquerait que les sites hydrophiles sont plus accessibles. Il est nécessaire d'avoir des valeurs d'activité de l'eau élevées pour observer la formation de plusieurs couches d'eau pour le thé M8. Ce comportement pourrait être dû à la présence à la surface des feuilles de thé noir de molécules ayant un caractère hydrophobe plus marqué suite à la phase d'oxydation spécifique aux thés noirs. Ces molécules pourraient alors constituer une barrière pour l'eau dans une première phase de sorption. Lorsque l'activité de l'eau devient supérieure à 0,7, l'eau devient solvant des macro-molécules pariétales (comme les pectines, les celluloses ou hémicelluloses). Pour cette phase, l'augmentation de la masse des thés en feuilles entières est identique et la pente semble plus importante que pour le thé LS. Ceci pourrait montrer une structure cellulaire plus endommagée, en accord avec le broyage mécanique. Avec les très fortes teneurs en eau, le thé vert M5 semble le plus apte à ad/absorber l'eau, ce qui pourrait être dû aux polyphénols non condensés possédant des fonctions hydroxyles, composés hydrosolubles.

3.1.2. Composition des feuilles de thé

L'analyse par ICP-AES en triplicat des feuilles non infusées minéralisées en milieu acide montre que les éléments majeurs y sont présents à des concentrations variables ce qui est en accord avec la littérature (cf. Tableau 1.4).

Le potassium est l'élément majoritaire avec des concentrations de l'ordre de 20 mg g⁻¹, la teneur de tous les autres éléments étant inférieure à 6 mg g⁻¹. Si les concentrations en calcium, potassium et magnésium restent proches quel que soit le thé considéré, une plus grande variabilité est observée pour les autres éléments (aluminium, fer, manganèse et zinc), certaines concentrations pouvant varier du simple au double. Nous pouvons aussi observer que, de manière générale, l'incertitude sur les concentrations des différents éléments analysés dans les feuilles de thé LC est plus grande que pour les autres thés.

Tableau 3.4 : Composition des feuilles de thés en éléments minéraux (mg g⁻¹ de matière sèche)

Thés	Éléments (mg g ⁻¹)								
	Ca	K	Mg	Al	Cu	Fe	Mn	Zn	Somme
LC	5,5 ± 0,7	16,7 ± 0,2	1,88 ± 0,05	1,1 ± 0,1	(20 ± 2).10 ⁻³	0,43 ± 0,15	0,8 ± 0,1	(22 ± 2).10 ⁻³	26 ± 1
LS	4,2 ± 0,7	20,4 ± 0,4	2,10 ± 0,02	0,81 ± 0,01	(19 ± 2).10 ⁻³	0,70 ± 0,15	1,22 ± 0,04	(27,1 ± 0,6).10 ⁻³	29 ± 1
Noir									
M6	3,9 ± 0,2	21,5 ± 0,3	2,40 ± 0,03	0,45 ± 0,02	(19 ± 1).10 ⁻³	0,33 ± 0,02	0,41 ± 0,05	(38 ± 1).10 ⁻³	29,0 ± 0,6
M8	5,1 ± 0,1	19,8 ± 0,5	1,98 ± 0,01	1,01 ± 0,03	(23 ± 1).10 ⁻³	0,47 ± 0,02	0,67 ± 0,02	(41,0 ± 0,2).10 ⁻³	29,1 ± 0,7
M2	3,6 ± 0,1	19,1 ± 0,7	1,89 ± 0,05	0,46 ± 0,04	(25 ± 2).10 ⁻³	0,338 ± 0,002	0,43 ± 0,01	(51 ± 1).10 ⁻³	25,9 ± 0,9
Vert									
M5	4,5 ± 0,5	21,0 ± 0,8	2,04 ± 0,15	0,58 ± 0,02	(28 ± 2).10 ⁻³	0,63 ± 0,03	0,91 ± 0,06	(47 ± 2).10 ⁻³	30 ± 2

Ceci est certainement dû à l'hétérogénéité des lots. En effet, nous avons observé un mélange de feuilles provenant de différentes origines, d'écorce de citron (3,1 %) et d'arômes de citron piégés sur charbon actif (11,2 %) (indication du fournisseur).

Un ensemble de 39 thés a été analysé par Xie *et al.* en 1998, parmi lesquels 10 provenaient de la province de Hu Bei en Chine (province d'origine du thé M2). Les minimum et maximum des concentrations des différents éléments mesurés encadrent les valeurs obtenues pour le thé M2 comme pour tous les autres thés (Tableau 3.5).

Tableau 3.5 : Comparaison entre les intervalles de concentrations des éléments inorganiques analysés dans les feuilles de thé (Xie *et al.*, 1998) et ceux obtenus dans le présent travail

Étude	Ca	K	Cu	Fe	Mn	Zn
				mg g ⁻¹		
Xie <i>et al.</i> (1998) ⁽¹⁾	1,5 – 6,0	15,0 – 30,7	8.10 ⁻³ – 40.10 ⁻³	0,05 – 1,8	0,16 – 1,5	20.10 ⁻³ – 40.10 ⁻³
Marcos <i>et al.</i> (1998) ⁽²⁾	2,6 – 3,5	–	7.10 ⁻³ – 32.10 ⁻³	0,075 – 0,285	0,4 – 1,6	19.10 ⁻³ – 35. 10 ⁻³
Cette étude	3,6 – 5,5	16,7 – 21,5	19.10 ⁻³ – 28.10 ⁻³	0,332 – 0,702	0,426 – 1,220	22.10 ⁻³ – 52. 10 ⁻³
Xie <i>et al.</i> (1998) ⁽³⁾	3,01 – 5,9	16,4 – 25,1	11,8.10 ⁻³ – 32,3.10 ⁻³	0,163 – 1,760	0,160 – 1,040	28,1.10 ⁻³ – 56,2.10 ⁻³
Thé M2	3,6 ± 0,1	19,1 ± 0,7	25.10 ⁻³ ± 2.10 ⁻³	0,338 ± 2	426 ± 10	51.10 ⁻³ ± 1.10 ⁻³

(1) : 2 thés blancs, 5 thés *Oolong*, 8 thés noirs, 21 thés verts et 3 thés autres (jasmin, jaune et « brick »)

(2) : 1 thé *Oolong*, 2 thés verts et 12 thés noirs

(3) : 10 thés verts de Hu Bei

Il est important de remarquer que la composition des feuilles de thé issues d'une même région présente une variabilité aussi importante que celle de feuilles de thés provenant de régions différentes. Ces différences de composition peuvent s'expliquer par la disparité des sols de culture mais aussi par les différents apports dus aux pesticides et/ou engrais (Marcos *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 1998).

La somme de tous les éléments minéraux représente environ 3 % de la masse des feuilles de thé. L'analyse élémentaire effectuée sur les feuilles de thé M8 (Tableau 3.6) montre que le complément est constitué de carbone, d'oxygène, d'azote et d'hydrogène (93 %). La matière organique constitue donc la majeure partie des feuilles de thé. Le complément de la masse est sans doute dû à la présence d'éléments non recherchés dans cette étude comme le soufre pouvant varier entre 2,4 et 5,0 mg g⁻¹, le phosphore variant entre 2,8 et 7,2 mg g⁻¹ et les éléments présents à l'état de traces (Xie *et al.*, 1998).

Tableau 3.6 : Compositions élémentaires organique et inorganique des feuilles de thé M8

Thé	Composition en éléments organiques (mg g ⁻¹)				Composition en éléments minéraux (mg g ⁻¹)	Somme (mg g ⁻¹)
	C	H	N	O		
M8	453 ± 2	58 ± 1	47 ± 2	371 ± 2	29,1 ± 0,7	958 ± 9

3.2. Les liqueurs de thé

Nous avons étudié la composition des liqueurs de thé en fonction de deux paramètres, la nature des feuilles de thé et la composition physico-chimique de l'eau utilisée pour réaliser la liqueur. Les liqueurs des différents types de thés ont été préparées avec de l'eau UP, trois eaux minérales naturelles et quatre eaux synthétiques de compositions variables.

3.2.1. Caractérisation des eaux

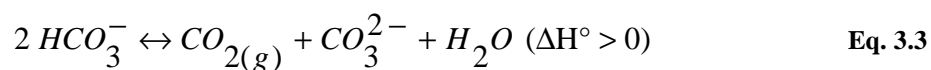
3.2.1.1. Eaux minérales naturelles

La composition des eaux a été déterminée avant et après chauffage (Tableau 3.7). Leur force ionique a été estimée à partir de la concentration en anions et en cations suivant la définition (Sigg *et al.*, 2000) :

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n C_i Z_i^2 \quad \text{Eq. 3.2}$$

où C_i est la concentration molaire de l'ion i et Z_i sa charge

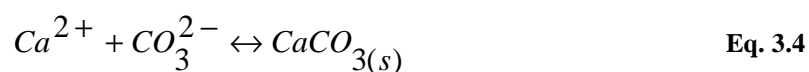
Le chauffage de l'eau à 95 °C influence les paramètres physico-chimiques. Notamment, la valeur du pH augmente après le chauffage. Cette évolution est due au déplacement de l'équilibre (3.3) de la gauche vers la droite, suivant la loi de Le Châtelier :



La perte de CO_2 lors du chauffage conduit à une diminution des ions hydrogénocarbonates en faveur des ions carbonates. Cette hypothèse est confortée par les concentrations en hydrogénocarbonates avant et après chauffage (Tableau 3.7).

La conductivité augmente dans le cas de l'eau MR et V et diminue pour les eaux T et Vi. Dans le cas de l'eau MR, cette augmentation est en accord avec celle des concentrations en anions (à l'exception des hydrogénocarbonates) et cations majeurs. Cette augmentation est due à l'évaporation de l'eau durant le chauffage. La réalisation de blancs avec les différentes eaux a montré que 94 % de la masse d'eau initialement pesée restait après le chauffage (cf. 3.2.2.2).

Dans le cas de l'eau Vi, la diminution de conductivité est due à la forte diminution de la concentration en calcium et en hydrogénocarbonates, du fait d'une part de l'évaporation et d'autre part de la précipitation de ces éléments sous forme de $\text{CaCO}_{3(s)}$, dépôt blanc observable au fond de la casserole, suivant la réaction :



avec $K_s = [\text{Ca}^{2+}] [\text{CO}_3^{2-}] = 5.10^{-9}$ (25 °C) (Sigg *et al.*, 2000).

Tableau 3.7 : pH, conductivité, composition anionique et cationique (mg L⁻¹) des eaux non chauffées et chauffées

Eaux		Anions (mg L ⁻¹)				Cations (mg L ⁻¹)				pH	σ ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Force ionique ⁽⁴⁾ (mmol L ⁻¹)
		Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Ca ²⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Na ⁺			
UP	n.c. ⁽¹⁾	n.d. ⁽³⁾	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,7 – 6,5	7,5 ± 0,2	
	c. ⁽²⁾	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		6,7 ± 0,2	
MR	n.c.	2,4 ± 0,1	4,9 ± 0,1	2,19 ± 0,03	2,16 ± 0,02	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,4 ± 0,1	2,8 ± 0,5	6,1	48,1 ± 0,1	0,30 ± 0,03
	c.	2,9 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,72 ± 0,03	2,70 ± 0,02	1,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	2,2 ± 0,5	7,1	62,9 ± 0,1	0,30 ± 0,03
T	n.c.	11,6 ± 0,1	330 ± 2	8,7 ± 0,2	17,8 ± 0,5	92 ± 1	0,8 ± 0,1	12,6 ± 0,5	4,1 ± 0,5	7,4	550 ± 1	9,1 ± 0,1
	c.	12,6 ± 0,1	213 ± 1	9,3 ± 0,2	19,5 ± 0,5	64 ± 3	0,9 ± 0,1	13,2 ± 0,5	4,3 ± 0,5	8,5	436 ± 3	6,8 ± 0,2
V	n.c.	14,4 ± 0,2	78 ± 1	6,3 ± 0,2	8,0 ± 0,2	13,2 ± 0,2	7,1 ± 0,1	8,6 ± 0,2	18,8 ± 0,5	6,7	185 ± 1	2,93 ± 0,06
	c.	15,5 ± 0,1	66,0 ± 0,3	7,5 ± 0,5	8,7 ± 0,4	14,4 ± 0,1	7,5 ± 0,1	9,5 ± 0,2	18,8 ± 0,5	8,1	200 ± 3	3,01 ± 0,05
Vi	n.c.	10,3 ± 0,1	281 ± 4	5,3 ± 0,4	338 ± 1	200 ± 1	2,5 ± 0,1	45 ± 1	7,7 ± 0,5	7,2	1104 ± 1	23,4 ± 0,2
	c.	11,0 ± 0,2	156 ± 1	5,5 ± 0,4	359 ± 3	151 ± 8	2,5 ± 0,1	47 ± 1	7,7 ± 0,5	8	1040 ± 2	20,5 ± 0,6

(1) : n.c. : non chauffée

(2) : c : chauffée

(3) : n.d. : non détecté

(4) : estimée à partir des compositions anionique et cationique

3.2.1.2. *Eaux synthétiques*

Dans le cas des eaux synthétiques, seule l'analyse des eaux après chauffage a été effectuée car seule celle-ci intervient lors de la réalisation des liqueurs de thé (Tableau 3.8).

La force ionique de l'eau avec ajout de $\text{CaCO}_{3(s)}$ est plus faible qu'attendue. Ceci est dû au fait que $[\text{Ca}^{2+}] \times [\text{CO}_3^{2-}] > K_s$, c'est-à-dire que le domaine de précipitation de $\text{CaCO}_{3(s)}$ est atteint. Dans ce cas, la concentration en calcium libre dans l'eau, $15,1 \pm 0,2 \text{ mg Ca L}^{-1}$, est faible.

Tableau 3.8 : pH, conductivité et composition anionique (mg L^{-1}) des eaux synthétiques chauffées

Eaux	Anions (mg L^{-1})				Ca^{2+}	Cations (mg L^{-1})			pH	σ ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Force ionique ⁽¹⁾ (mmol L^{-1})
	Cl^-	HCO_3^-	NO_3^-	SO_4^{2-}		Mg^{2+}	Na^+	K^+			
MR + CaCl_2 B ⁽²⁾	254 ± 3	$2,5 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2$	168 ± 9	$0,80 \pm 0,01$	$2,3 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,1$	6,8	824 ± 1	$12,2 \pm 0,5$
MR + CaCl_2 H ⁽³⁾	358 ± 2	$3,5 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,2$	197 ± 3	$0,80 \pm 0,01$	$2,1 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,1$	6,9	1126 ± 1	$15,1 \pm 0,2$
MR + CaSO_4	$3,07 \pm 0,04$	$2,4 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,1$	474 ± 4	216 ± 1	$0,81 \pm 0,01$	$3,1 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,1$	6,7	887 ± 1	$20,9 \pm 0,2$
MR + CaCO_3	$3,42 \pm 0,07$	$3,5 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	$32,5 \pm 0,3$	225 ± 7	$0,80 \pm 0,01$	$2,9 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,1$	8	$135,8 \pm 0,2$	$1,64 \pm 0,03$

(1) : estimée à partir de compositions anionique et cationique

(2) : $[\text{Ca}^{2+}] = 160 \text{ mg L}^{-1}$ (3) : $[\text{Ca}^{2+}] = 190 \text{ mg L}^{-1}$

3.2.2. Préparation des liqueurs de thé

3.2.2.1. Influence du traitement subi par les feuilles sur la réhydratation durant l'infusion

Les feuilles avant infusion contiennent environ 8 % d'humidité. Lors de l'infusion, elles se réhydratent. Les feuilles ont été pesées 2 min après la fin de leur infusion dans l'eau UP.

Les résultats obtenus à partir de trois liqueurs pour chaque thé montrent que les feuilles broyées mécaniquement ont tendance à absorber plus d'eau que les feuilles entières (Tableau 3.9). De plus, les feuilles broyées manuellement ont moins de capacité à absorber de l'eau que les feuilles broyées mécaniquement mais plus que les mêmes feuilles non broyées. L'incertitude est plus importante pour les feuilles LS car il est plus difficile de récupérer toutes les particules.

Après la pesée, les feuilles humides sont placées dans une étuve à 103 °C durant 24 h pour les sécher. Les feuilles sont ensuite transférées dans un dessiccateur avant d'être pesées à nouveau. L'extraction des composés organiques et minéraux durant l'infusion conduit à une diminution de la masse des feuilles, diminution qui semble plus importante dans le cas des feuilles broyées (Tableau 3.9).

Tableau 3.9 : Variation de la masse des feuilles juste après l'infusion et après leur séchage suite à l'infusion

Type	Thés	Variation de masse après infusion (g g ⁻¹ de feuilles initialement)	Variation de masse après infusion et séchage (g g ⁻¹ de feuilles initialement)
Noir	LS	+4,9 ± 0,3	-0,36 ± 0,05
	M8	+4,1 ± 0,2	-0,170 ± 0,007
	M6	+3,27 ± 0,05	-0,190 ± 0,002
Vert	M5	+3,08 ± 0,02	-0,168 ± 0,003
	M5 B	+3,90 ± 0,03	-0,30 ± 0,03

3.2.2.2. Volume de liqueur obtenue

Malgré la présence d'un couvercle lors du chauffage de l'eau, nous avons observé une diminution de la masse d'eau réellement versée sur les feuilles. Cette perte d'eau, estimée à partir du chauffage de six échantillons d'eau UP, est de 6 ± 2 %.

Du fait de la réhydratation des feuilles durant l'infusion, la masse de liqueur obtenue après infusion est inférieure à la masse d'eau initialement prélevée (Figure 3.3). Cette variation a été prise en compte dans les différents calculs durant toute l'étude.

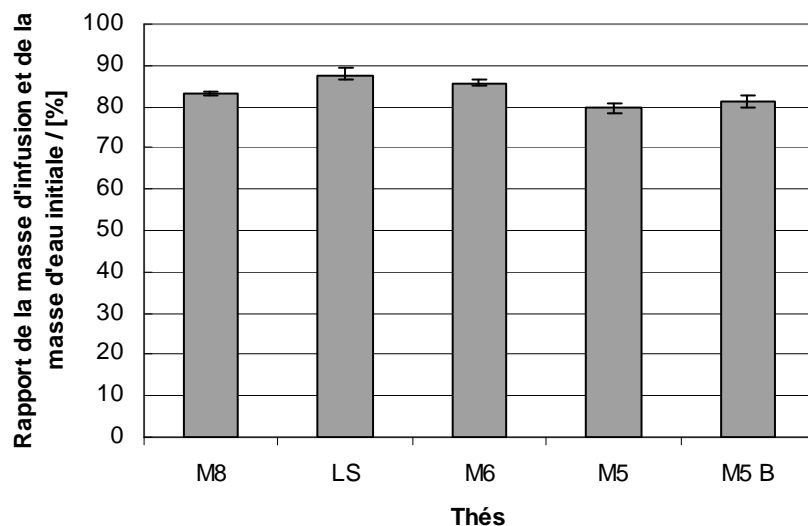


Figure 3.3 : Masse de la liqueur rapportée à la masse d'eau initialement pesée (%)

3.2.2.3. Effet de la durée entre la réalisation de la liqueur et le temps d'analyse

Les tests ont été réalisés à l'aide du thé vert M5 et de l'eau Mont-Roucou.

Différentes liqueurs ont été préparées le même jour de la semaine durant trois semaines consécutives puis filtrées et analysées par ICP-AES le jour J. À J-1 (veille des analyses), une liqueur de contrôle a été préparée et l'ensemble des liqueurs a été minéralisé avant leur analyse le jour J. Les résultats obtenus pour le calcium sont représentés dans la Figure 3.4.

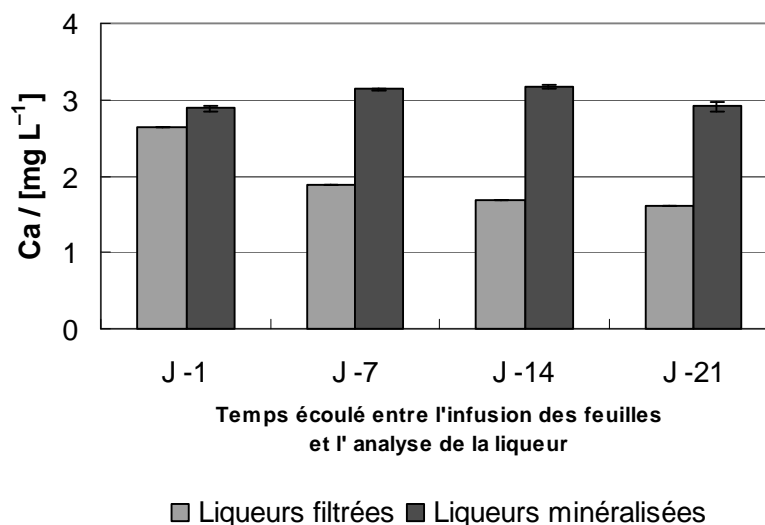


Figure 3.4 : Évolution de la concentration en calcium en fonction de la durée entre la réalisation de la liqueur et l'analyse

Les résultats pour les autres éléments sont présentés dans le Tableau 3.10.

Tableau 3.10 : Moyenne des concentrations dans les quatre liqueurs de thé M5 réalisées durant trois semaines consécutives et analysées après filtration et minéralisation

Élément	Concentration (mg L ⁻¹) dans les liqueurs			
	Filtrées		Minéralisées	
	Moyenne	Écart relatif (%)	Moyenne	Écart relatif (%)
Al	1,7 ± 0,2	9	1,9 ± 0,2	13
Ca	2,0 ± 0,5	24	3,0 ± 0,1	5
Fe	3,0 ± 0,1	5	2,9 ± 0,1	4
Mg	9,6 ± 0,4	4	12,2 ± 0,7	6
Mn	5,1 ± 0,2	4	5,5 ± 0,2	4

Pour le calcium, nous observons un fort effet de la filtration. Plus le temps écoulé est important, plus la quantité de calcium analysée diminue, cela pourrait être dû à son rôle joué dans la formation de la crème de thé. De plus, la durée semble également influencer la teneur en aluminium dans le cas des liqueurs minéralisées car l'écart relatif des différentes valeurs est le plus élevé. Ces différences pourraient être dues à des interactions avec le contenant. Suite à cette étude préliminaire, il a été décidé de réaliser les analyses des liqueurs le même jour que leur préparation.

3.2.2.4. Reproductibilité des liqueurs

Les tests de reproductibilité concernant l'analyse des éléments majeurs ont été effectués avec le thé noir M8 et l'eau Mont-Roucou. Six liqueurs ont été préparées puis filtrées avant l'analyse (Tableau 3.11).

Tableau 3.11 : Résultats de concentrations dans six liqueurs analysées trois fois chacune

Liqueur	pH	Éléments (mg L ⁻¹)						
		Al	Ca	Fe	Mg	Mn	Na	K
1	5,50	1,72	1,94	3,20	8,12	1,86	1,4	215
2	5,45	1,65	1,96	3,41	8,56	1,93	2,1	228
3	5,42	1,73	1,90	3,32	8,66	1,81	1,6	236
4	5,45	1,79	1,64	3,40	8,04	1,81	1,2	214
5	5,47	1,77	1,66	3,46	7,52	1,78	1,0	215
6	5,47	1,80	1,84	3,50	8,41	1,77	1,2	215
Moyenne	5,46 ± 0,03	1,75 ± 0,05	1,8 ± 0,1	3,4 ± 0,1	8,3 ± 0,4	1,82 ± 0,05	1,4 ± 0,4	221 ± 9

N.B. Pour chaque liqueur, trois mesures ont été faites. Seule la valeur moyenne par liqueur est reportée. Par contre, les valeurs des moyennes globales ainsi que celles des écarts-types portent sur les 18 mesures.

Au vu des écarts-types observés, les échantillons présentent une bonne reproductibilité à l'exception du sodium. Pour cet élément, le problème provient des faibles valeurs observées dans les liqueurs comparées à l'incertitude de l'appareil (cf. 2.3.2.1.4).

3.2.2.5. Effet de la température

La température de l'eau préconisée pour les thés verts est souvent inférieure à celle des thés noirs. Par exemple, pour le thé M2, la température conseillée est 70 °C contre 95 °C pour les autres thés. Afin de contrôler l'influence de la température, les thés verts ont été infusés à ces deux températures dans l'eau UP puis la matière organique totale ainsi que les éléments majoritaires ont été analysés.

Tableau 3.12 : Concentration (mg L⁻¹) dans les liqueurs de thés verts réalisées à 70 et 95 °C

Thé	Température (°C)	COD (mg L ⁻¹)	Al (mg L ⁻¹)	Ca (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)
M2	70	1300 ± 40	0,51 ± 0,07	1,45 ± 0,05	298 ± 1
	95	2040 ± 60	0,74 ± 0,06	1,95 ± 0,06	368 ± 1
M5	70	1370 ± 40	2,19 ± 0,06	0,92 ± 0,05	335 ± 1
	95	2330 ± 70	3,24 ± 0,07	1,44 ± 0,05	429 ± 1

L'extraction des éléments analysés est favorisée par une augmentation de température quel que soit le rendement d'extraction (cf. 1.3.3). Cette variation est de l'ordre de 20 à 40 % suivant l'élément considéré.

Étant donné l'impossibilité de comparer des liqueurs réalisées à des températures différentes, nous avons opté, dans notre étude, pour une température d'infusion de 95 °C.

3.2.3. Influence de la nature du thé sur les propriétés physico-chimiques des liqueurs de thé

Pour étudier l'influence de la nature du thé sur la composition des liqueurs de thé, les feuilles ont été infusées avec une même eau, l'eau UP, et avec des conditions de température et des durées d'infusion identiques (95 °C et 3 min respectivement).

3.2.3.1. pH des liqueurs

Le pH de l'eau UP seule est difficile à mesurer et varie entre 5,7 et 6,5. En effet, suite au traitement de purification, très peu d'ions sont présents en solution, à l'exception des hydrogénocarbonates issus de la dissolution du CO₂ présent dans l'atmosphère, ce qui rend la mesure difficile. Le pH des liqueurs de thé est acide quel que soit le thé utilisé et varie entre 4,2 et 6,0. Cette acidité est due à la présence des composés organiques, notamment les catéchines, contenus dans les feuilles de thé qui se comportent comme des acides faibles plus ou moins dissociés (cf. Tableau 1.3).

De plus, les liqueurs préparées avec les feuilles de thés noirs sont plus acides (4,2 à 5,4) que celles réalisées avec les feuilles de thés verts (5,6 à 6,0), ce qui pourrait être dû aux formes différentes des polyphénols, monomères dans les thés verts et formes polymérisées dans le thé noir, et donc au nombre de fonctions acides (Xie *et al.*, 1998). Par ailleurs, la liqueur préparée à partir du thé comportant du citron est plus acide que toutes les autres. Ceci est certainement lié à la présence d'acides organiques comme les acides hydroxycinnamiques, tels que les acides caféique, férulique, *p*-coumarique, dont les pK_{a_i} varient entre 4,21 et 4,32 (Prasain *et al.*, 2004; Erdemgil *et al.*, 2007) ainsi que les acides citrique et ascorbique (Tableau 3.13).

Tableau 3.13 : Constantes de protonation des acides ascorbique et citrique

Ligands	Log $\beta^{(1)}$ (Martell & Smith, 1977; 1989)	
	AscH ₂	CitH ₃
[HL]/[H][L]	11,34	5,69
[H ₂ L]/[H][LH]	4,03	4,35
[H ₃ L]/[H][L ₂ H]	–	2,87

(1) : log β à 25 °C pour I = 0,1 M

Le broyage des feuilles de thé vert M5 semble induire une légère augmentation du pH de la liqueur pouvant être liée à la perte de composés acides volatils.

3.2.3.2. Extraction des éléments minéraux

Les liqueurs non filtrées ont ensuite été minéralisées puis analysées par ICP-AES afin de déterminer la teneur totale en éléments. Les intervalles de concentrations ainsi que les moyennes obtenus sont reportés dans le Tableau 3.14.

Tableau 3.14 : Domaine de concentrations d'éléments minéraux contenus dans les liqueurs après leur minéralisation acide

Élément	Intervalle de concentrations (mg L ⁻¹)
K	56 – 339
Ca	0,65 – 4,02
Mg	3,1 – 27
Al	0,74 – 2,6
Mn	0,92 – 10,4
Fe	0,59 – 9,1
Cu	0,017 – 0,117
Zn	0,025 – 0,665

Les ordres de grandeur des concentrations correspondent, à l'exception du fer, à ceux de la littérature (cf. Tableau 1.8).

Afin de comparer les différents thés, les rendements d'extraction des éléments minéraux dans les liqueurs minéralisées sont représentés dans la Figure 3.5.

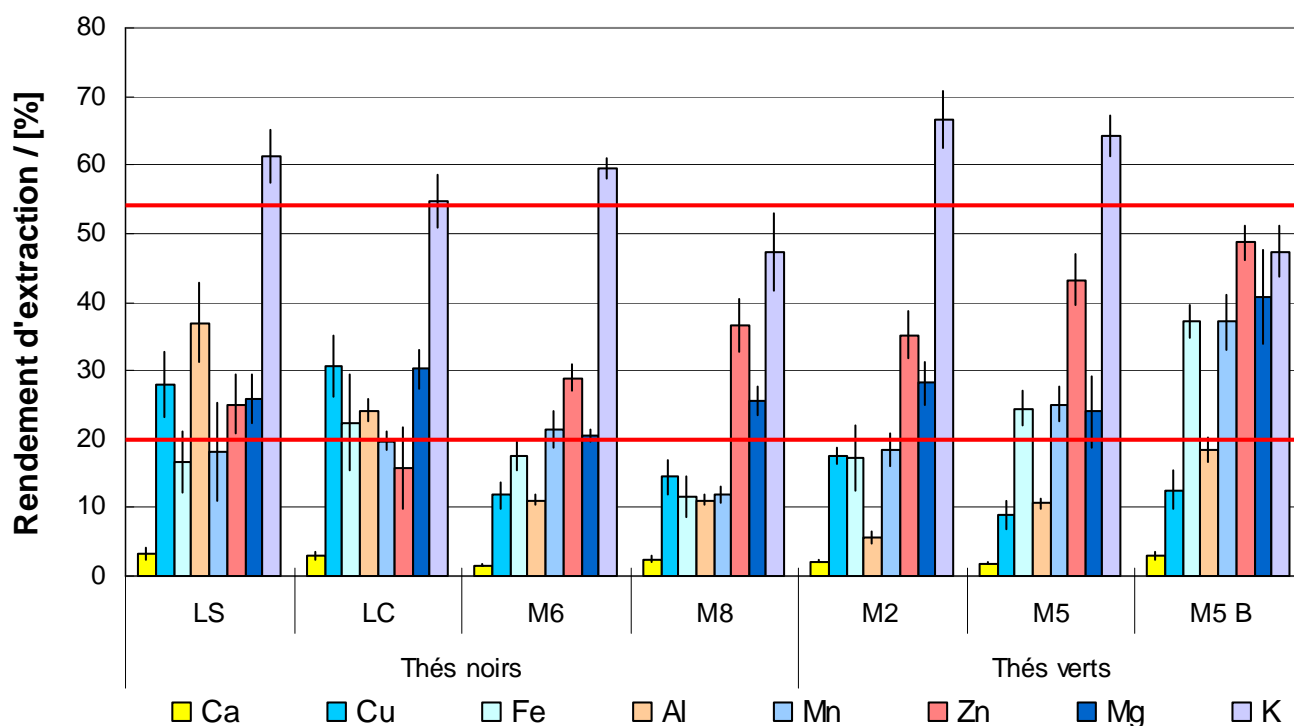


Figure 3.5 : Rendement d'extraction d'éléments minéraux présents dans les feuilles de thé infusées dans l'eau UP à 95 °C durant 3 min en fonction de l'origine des thés. Les lignes rouges représentent les catégories d'extraction définies au Chapitre 1 (cf. 1.3.3.1)

Les résultats sont en accord avec la littérature pour le calcium, le magnésium, le potassium, mais aussi pour le manganèse et le zinc compte tenu des incertitudes (Odegard & Lund, 1997;

Matsuura *et al.*, 2000; Matsuura *et al.*, 2001). Le calcium est faiblement extractible ($< 20 \%$), le magnésium, le manganèse et le zinc sont moyennement extraits ($20 < R < 55 \%$) et le potassium fortement extrait ($> 55 \%$). Par contre, les rendements pour le fer, le cuivre et l'aluminium présentent des différences notables. Ainsi, le cuivre apparaît légèrement plus extrait (30 % au lieu de 20 %) pour les thés LS et LC. Le fer est plus extrait pour le thé M5 et M5B ($R > 20 \%$ au lieu de $R < 20 \%$). Les rendements d'extraction de l'aluminium, calculés pour toutes les liqueurs préparées à partir des feuilles entières, sont inférieurs ou égaux à 10 %. Ces données sont inférieures à celles de la littérature qui sont données $> 20 \%$. Dans le cas des thés broyés, les rendements d'extraction sont effectivement supérieurs à 20 %. Les études établissant les catégories d'extraction de l'ensemble des éléments portaient sur des feuilles broyées. Pour l'aluminium, il semble que le broyage des feuilles ait une influence particulière. Ce point est en accord avec l'augmentation du rendement d'extraction dans le cas du broyage manuel du thé M5.

3.2.4. Influence de la nature de l'eau : Eaux minérales naturelles

L'influence de la composition de ces eaux a été évaluée en mesurant le pH et les rendements d'extraction dans les liqueurs.

3.2.4.1. pH des liqueurs

Le pH de toutes les liqueurs a été mesuré après retour à température ambiante (20 à 25 °C) avec une incertitude de mesure de $\pm 0,1$ unité de pH (Tableau 3.15). Il est comparé dans tous les cas aux pH des eaux avant (n.c.) et après chauffage (c.).

Tableau 3.15 : pH des liqueurs de thé réalisées avec des différentes eaux

Thé	UP	MR	Eau V	Vi	T
n.c. ⁽¹⁾	5,7 – 6,5	6,1	6,7	7,2	7,4
c. ⁽²⁾		7,1	8,1	8	8,5
LS	4,6	5,3	6,8	7,3	7,3
LC	4,2	4,6	5,8	7,2	7,3
M6	5,4	5,8	6,5	7,2	7,4
M8	5,4	5,4	6,1	7,6	7,5
M2	5,6	5,8	6,3	7,1	6,9
M5	5,7	6,0	6,3	7,3	7,4

(1) : n.c. : non chauffée

(2) : c : chauffée

Les liqueurs préparées avec les eaux UP, MR et V ont des valeurs de pH acide (4,2 à 6,8), à la différence des eaux Vi et T pour lesquelles le pH des liqueurs varie entre 7 et 8 y compris dans le cas du thé LC.

Il est possible que la forte teneur en hydrogénocarbonates des eaux Vi et T neutralise l'apport acide dû aux polyphénols ou acides divers pour le thé LC. Cette capacité des eaux à neutraliser les acides ou alcalinité (ANC) peut être calculée à partir de l'équation 3.5 (Sigg *et al.*, 2000) :

$$\text{ANC} = [\text{HCO}_3^-] + 2 [\text{CO}_3^{2-}] + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+] \quad \text{Eq. 3.5}$$

où les concentrations sont exprimées en mol L^{-1} .

Les valeurs d'ANC estimées pour les eaux minérales à l'aide des valeurs de pH et de leur teneur en hydrogénocarbonates sont reportées dans le Tableau 3.16.

Tableau 3.16 : Effet du chauffage sur l'alcalinité calculée (mmol L^{-1}) des eaux utilisées pour préparer les liqueurs de thé

Eaux		Alcalinité (mmol L^{-1})
UP		n.m. ⁽¹⁾
MR	n.c.	$0,080 \pm 0,001$
	c.	$0,040 \pm 0,002$
V	n.c.	$1,28 \pm 0,02$
	c.	$1,08 \pm 0,01$
Vi	n.c.	$4,61 \pm 0,07$
	c.	$2,56 \pm 0,02$
T	n.c.	$5,41 \pm 0,03$
	c.	$3,49 \pm 0,02$

(1) : non mesurable

Ces valeurs montrent que les eaux Vi et T possèdent une capacité à neutraliser les acides plus importante que les autres eaux confirmant ainsi la plus faible variation de pH observée après infusion des feuilles de thé.

3.2.4.2. Formation de l'écume de thé

L'écume de thé, à la différence de la crème de thé, n'apparaît que dans les eaux contenant du calcium et des hydrogénocarbonates (Spiro & Jaganyi, 1993) (cf. 1.3.2.2.2). Ceci a été confirmé pour les liqueurs obtenues avec les eaux Vi et T. Par contre, l'écume de thé a été

observée dans notre cas après refroidissement des liqueurs, contrairement aux études de Spiro et collaborateurs qui ont caractérisé une écume obtenue par chauffage continu à 80 °C (Spiro & Jaganyi, 1994a; 1994b). Dans les études de ces auteurs, il n'est pas précisé si les compositions des eaux données sont celles avant ou après chauffage, paramètre pourtant important étant donné les variations observées précédemment. L'eau T, avant chauffage, possède une composition très proche en Ca^{2+} et HCO_3^- , *i.e.* 92 mg L⁻¹ et 330 mg L⁻¹ respectivement, de l'eau utilisée par Spiro et Jaganyi (1994a,b), *i.e.* 108,8 mg L⁻¹ et 333,84 mg L⁻¹, tandis qu'après chauffage, l'eau T ne contient plus que 64 mg L⁻¹ et 213,5 mg L⁻¹ en Ca^{2+} et HCO_3^- soit une diminution de 30 et 35 % respectivement. Dans le cas de l'eau Vi après chauffage, les concentrations en Ca^{2+} et HCO_3^- sont 150 mg L⁻¹ et 156 mg L⁻¹, soit 50 % de calcium en plus par rapport à l'étude de Spiro et Jaganyi mais 50 % d'hydrogénocarbonates en moins. Pour compléter ce travail, nous avons observé l'écume obtenue avec l'eau Vi à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB). Une analyse quantitative a pu être réalisée avec le détecteur EDS couplé au MEB. L'analyse élémentaire a été déterminée en différents points de l'écume, points reportés sur la Figure 3.6.

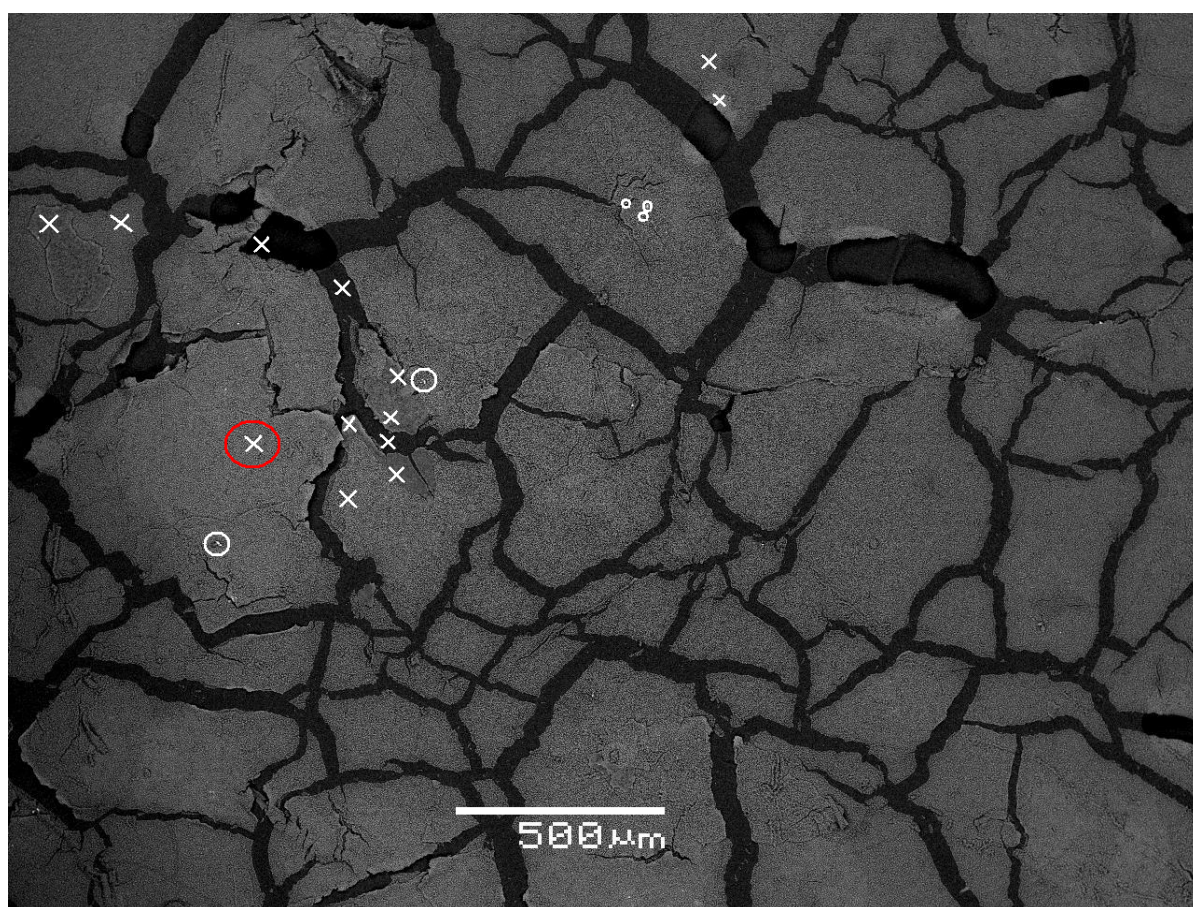


Figure 3.6 : Image d'écume de thé obtenue par analyse par MEB (eau Vi et thé M8)

Les spectres ont été tracés entre 0 et 20 keV mais aucun signal n'a été détecté entre 10 et 20 keV. Les spectres obtenus majoritairement correspondent à celui présenté dans la Figure 3.7, montrant la présence majoritairement de Ca, C et O ainsi que de P, Mg, Mn, Na et K. Sur quelques spectres, la présence de Zn, Si, Al et Pb a été déterminée, présence pouvant être due à des pollutions extérieures lors de la préparation de l'échantillon.

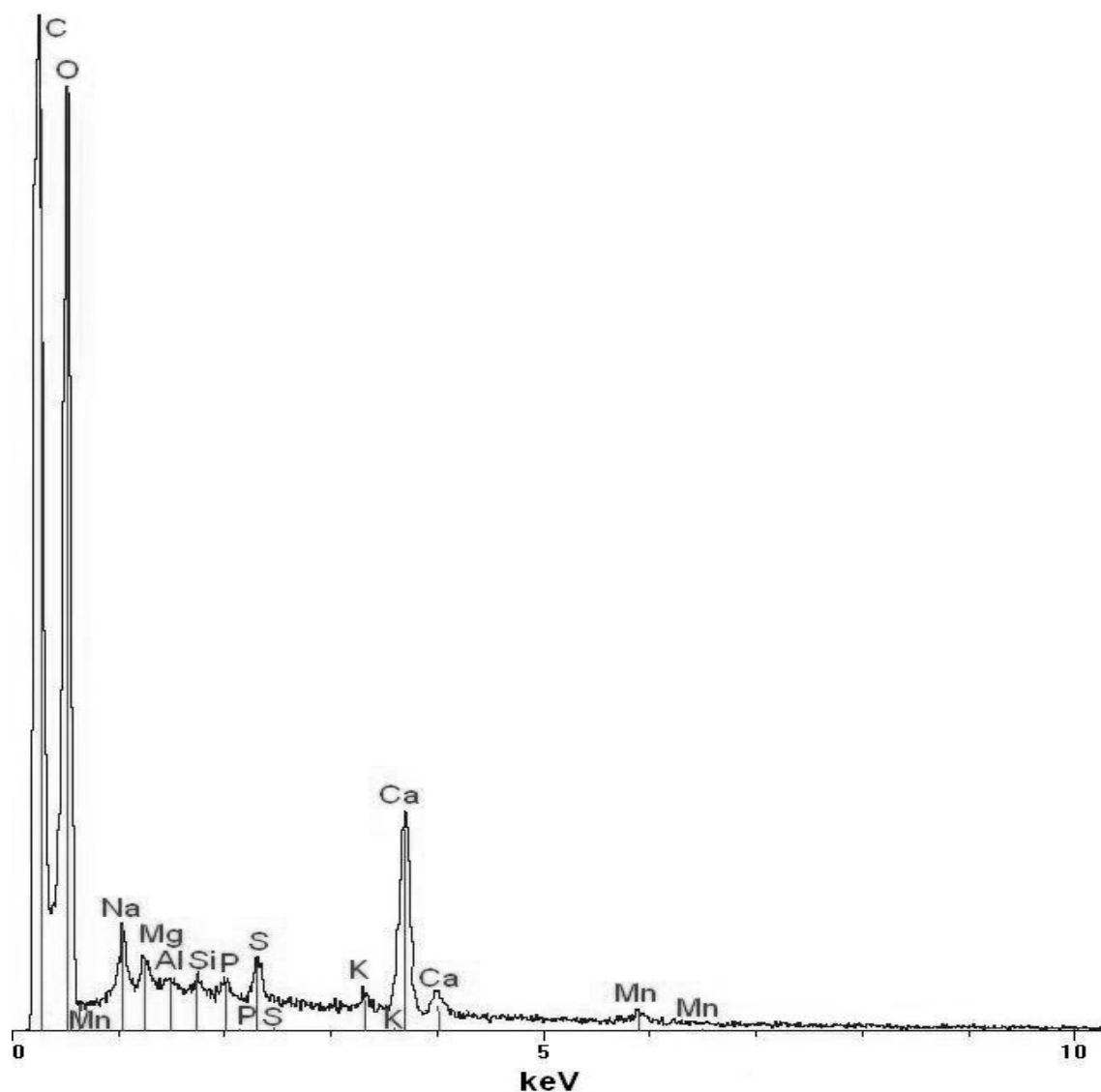
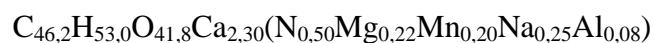


Figure 3.7 : Spectre EDS de l'écume de thé obtenu par analyse du point entouré en rouge sur la Figure 3.6 (eau Vi et thé M8)

Cette observation est en accord avec la formule générale de l'écume de thé donnée en 1994 après analyse élémentaire de l'écume (Spiro & Jaganyi, 1994a) :



L'écume de thé observée dans cette étude après refroidissement correspond à celle observée par Spiro et Jaganyi à chaud. L'absence d'écume dans le cas des eaux MR et V montre que son apparition nécessite une teneur minimale en calcium et hydrogénocarbonate, condition satisfaite avec l'eau T et d'autant plus avec l'eau Vi.

3.2.4.3. Extraction de la matière organique

La teneur en COD a été mesurée sur les liqueurs obtenues avec les eaux UP, MR, V et Vi, après filtration, à l'aide d'un COT-mètre (cf. 2.3.2.1.4) (Figure 3.8.)

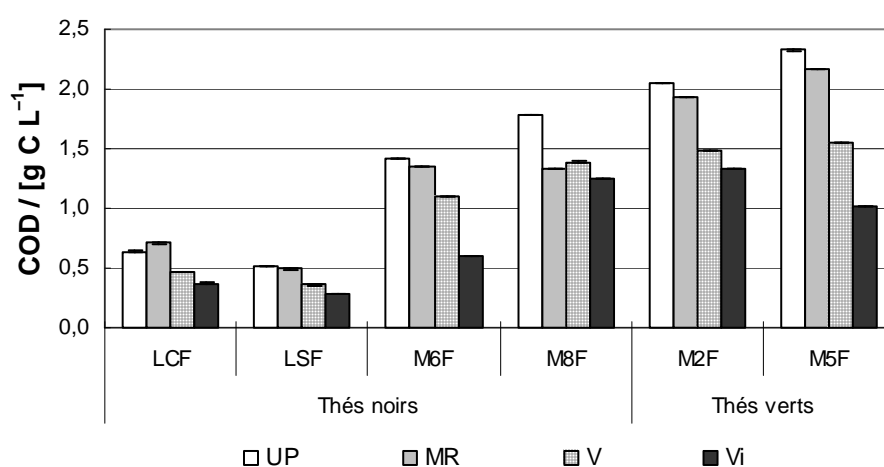


Figure 3.8 : Concentrations en carbone organique dissous (g C L^{-1}) dans les liqueurs de thé après filtration ($0,45 \mu\text{m}$) en fonction de la composition chimique de l'eau et du thé utilisés

Les valeurs de COD obtenues montrent que l'extraction de la matière organique semble diminuer lorsque la minéralisation de l'eau augmente ce qui confirme les résultats obtenus par Spiro et collaborateurs (Spiro & Price, 1987b; Spiro *et al.*, 1987). Les grandes différences entre les concentrations pour les thés en feuilles broyées et les thés en feuilles entières proviennent de la quantité de feuilles utilisées. Aussi, les résultats ont-ils été recalculés et exprimés en mg de C extrait par g de feuilles infusées (cf. Tableau 2.1) (Figure 3.9).

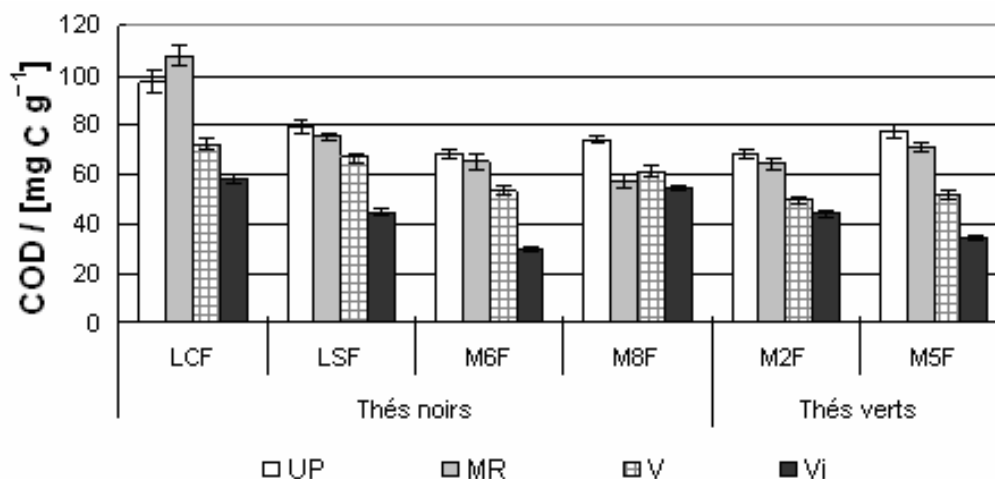


Figure 3.9 : Concentrations en carbone organique dissous extrait par gramme de feuilles initialement pesées pour réaliser les liqueurs (mg C g^{-1})

Tableau 3.17 : Diminution (%) de l'extraction de COD par gramme de feuilles par rapport à l'eau UP pour les différentes eaux et les différents thés

Thé	MR	Eau V	Vi
LCF	-11	26	69
LSF	5	16	77
M6F	5	22	132
M8F	23	18	36
M2F	6	27	53
M5F	8	34	129

À l'aide de cette normalisation, il apparaît que l'extraction du carbone organique diminue fortement dans le cas de l'eau Vi. Par ailleurs, l'influence de la minéralisation est variable suivant le thé considéré. Cet effet est plus important pour les thés M6 et M5 et plus faible dans le cas des thés M8 et M2. Les thés en feuilles broyées ont un comportement intermédiaire. Il apparaît donc que l'augmentation de la minéralisation de l'eau entraîne une diminution de l'extraction de la matière organique, plus ou moins importante suivant le thé considéré, qu'il soit noir ou vert, en feuilles entières ou broyées.

3.2.4.4. Extraction de la matière minérale

Pour étudier l'influence du thé et de la nature de l'eau sur l'extraction de la matière minérale, les liqueurs ont été minéralisées et analysées par ICP-AES afin de déterminer les concentrations totales en éléments majeurs et de calculer ensuite leurs rendements d'extraction compte tenu des concentrations mesurées dans les feuilles de thé (Figures 3.10 et 3.11).

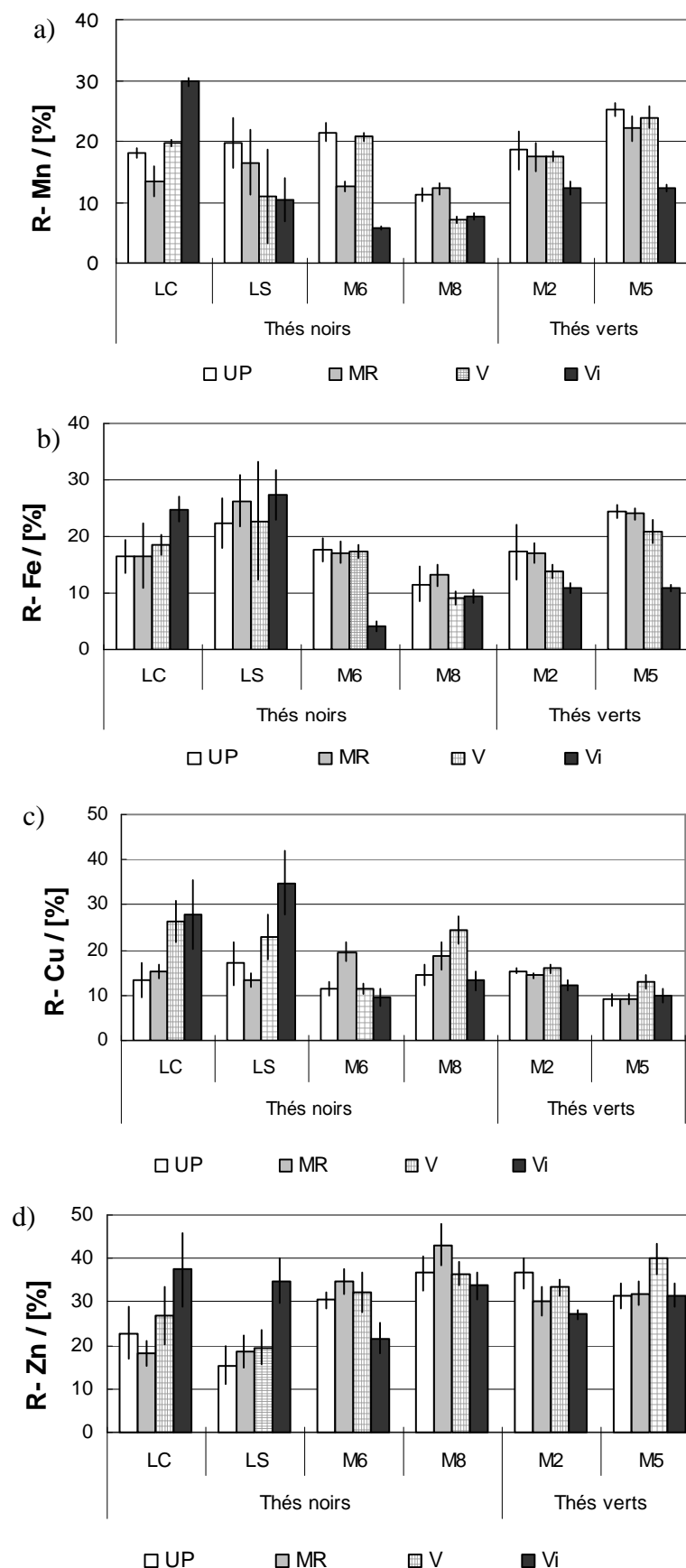


Figure 3.10 : Rendement d'extraction des éléments inorganiques : a) manganèse, b) fer, c) cuivre, et d) zinc en fonction des eaux et thés utilisés

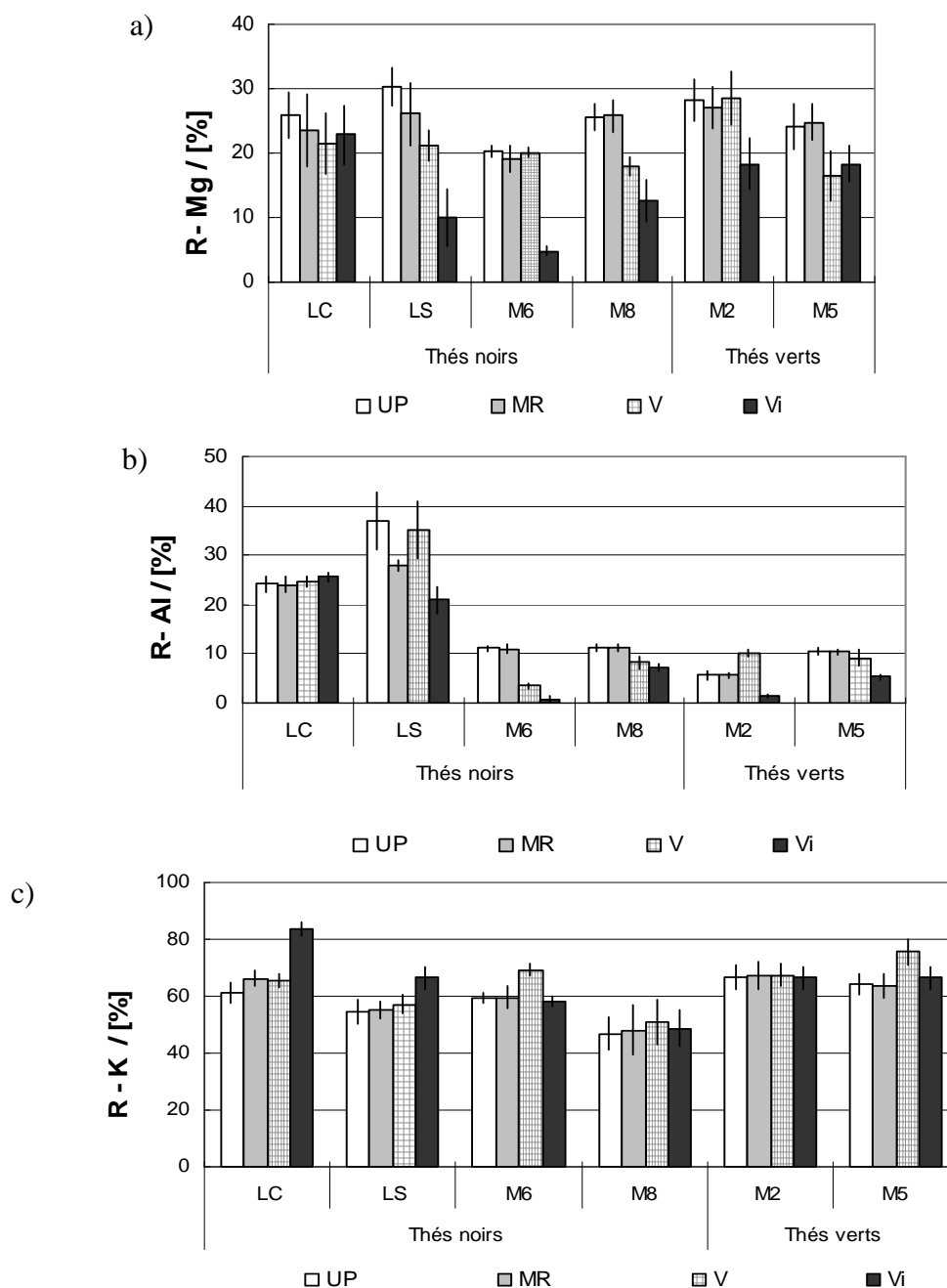


Figure 3.11 : Rendement d'extraction des éléments inorganiques : a) magnésium, b) aluminium, et c) potassium en fonction des eaux et thés utilisés

Les éléments peuvent être regroupés en fonction de l'effet d'une eau donnée sur leur extraction. Pour le fer et le manganèse, le rendement d'extraction augmente avec la minéralisation de l'eau pour le thé LC alors qu'il semble diminuer pour tous les autres thés. Dans le cas du cuivre et du zinc, le rendement augmente avec la minéralisation, si les thés sont broyés. Par contre pour ces deux éléments, la nature de l'eau ne semble n'avoir aucune influence si les feuilles sont entières.

Seul le thé LC présente une variation du rendement d'extraction du potassium en fonction de l'eau. A l'opposé, l'extraction de l'aluminium et du magnésium est favorisée par une faible minéralisation de l'eau sauf pour le thé LC.

Au vu de tous ces résultats, l'influence de l'eau semble liée à la nature de l'élément, au pH et à l'état physique des feuilles de thé.

Par ailleurs, la présence de calcium à forte teneur dans les eaux V et Vi n'a pas permis de calculer son rendement d'extraction car les concentrations analysées dans les liqueurs sont inférieures à celles de l'eau chauffée. Dans le cas des eaux UP et MR, le calcium n'est que faiblement extrait (valeur inférieure à 5 %) (Figure 3.12).

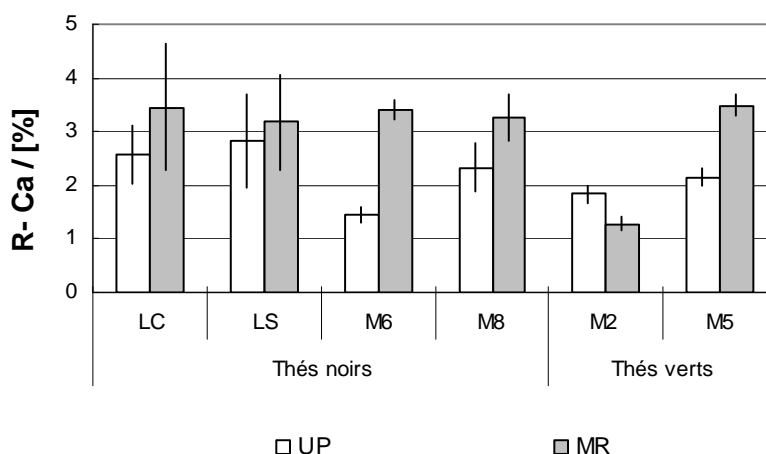


Figure 3.12 : Rendement d'extraction du calcium pour les eaux UP et MR en fonction des différents thés

Pour les thés LS et LC, l'extraction du calcium ne dépend pas de l'eau utilisée. En considérant les thés en feuilles entières, à l'exception du thé M2, la faible minéralisation de l'eau MR suffit à augmenter l'extraction par rapport à l'eau pure.

À défaut des rendements d'extraction, les concentrations en calcium des eaux témoins et des liqueurs de thés ont été comparées (Figure 3.13).

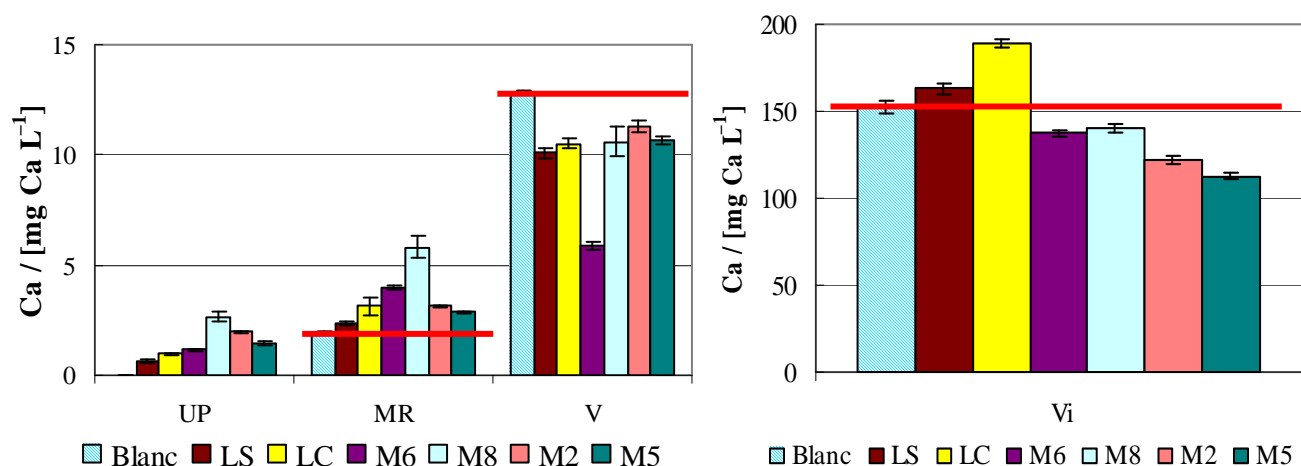


Figure 3.13 : Concentrations (mg Ca L^{-1}) en calcium dans les eaux témoins (matérialisées par les lignes rouges) et les différentes liqueurs de thé

Il apparaît que le flux de calcium est inversé par rapport aux autres éléments, flux allant de l'eau vers la feuille. Cette observation est en accord avec l'étude menée par Anderson *et al.* (1971) (Anderson *et al.*, 1971). Le bilan massique calculé pour les feuilles de thé M8 le confirme (Tableau 3.18) : une partie du calcium présent dans l'eau est absorbée par ou adsorbée sur les feuilles durant l'infusion.

Tableau 3.18 : Bilan massique du calcium dans les feuilles et les liqueurs de thé M8, avant et après infusion

Eau	Bilan en Ca (mg) Avant l'infusion			Bilan en Ca (mg) Après l'infusion		
	Feuilles	Eau	Total	Feuilles	Liqueur	Total
UP	19 ± 1	0	19 ± 1	$14,0 \pm 0,8$	$0,44 \pm 0,04$	$14,4 \pm 0,8$
MR	19 ± 1	$0,32 \pm 0,04$	19 ± 1	$19,2 \pm 0,8$	$1,2 \pm 0,4$	20 ± 1
V	19 ± 1	$2,4 \pm 0,4$	21 ± 1	$18,8 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,04$	$20,8 \pm 0,4$
Vi	19 ± 1	$28,8 \pm 0,4$	48 ± 1	$23,2 \pm 0,8$	$26,4 \pm 0,8$	50 ± 2

Dans le cas de l'eau Vi, l'augmentation de masse des feuilles est de 4,2 mg. Comme la masse de feuilles infusées est de 4 g, l'augmentation massique des feuilles est globalement de 1 mg g^{-1} .

De cet ensemble d'observations, il apparaît que la composition de l'eau utilisée pour préparer la liqueur de thé influence notablement l'extraction des éléments minéraux à partir des feuilles. Cependant, cet effet dépend de l'élément considéré.

3.2.5. Influence de la nature de l'eau : Eaux synthétiques

Dans cette partie de l'étude, nous avons étudié l'influence de la minéralisation de l'eau et notamment du calcium tout en contrôlant les paramètres que sont le pH, la force ionique et le contre-ion du calcium, dans notre cas le chlorure, le sulfate et l'hydrogénocarbonate. Pour cela, nous avons préparé différentes eaux synthétiques par ajout de sels de calcium dans l'eau MR. Dans cette partie, seul le thé noir Darjeeling M8 a été utilisé afin de pouvoir comparer directement les concentrations analysées puisque les mêmes conditions ont été utilisées.

3.2.5.1. pH et conductivité des liqueurs

Le pH des liqueurs préparées avec les eaux UP, MR, Vi et les eaux synthétiques varie entre 5,4 et 7,8 (Tableau 3.19).

Tableau 3.19 : Évolution du pH et de la conductivité des eaux synthétiques chauffées et des liqueurs de thé M8 correspondantes

Eau	pH		Liqueur	
	Eau après chauffage	pH	σ ($\mu\text{S cm}^{-1}$) ⁽¹⁾	$\Delta\sigma$ ($\mu\text{S cm}^{-1}$) ⁽²⁾
UP	5,7 – 6,5	5,4	649 ± 25	642 ± 25
MR	7,1	5,4	662 ± 11	599 ± 11
Vi	8,0	7,6	1321 ± 53	281 ± 55
MR + CaCl ₂ B ⁽³⁾	6,8	5,4	1275 ± 47	451 ± 48
MR + CaCl ₂ H ⁽⁴⁾	6,9	5,4	1538 ± 8	412 ± 9
MR + CaSO ₄	6,7	5,4	1250 ± 10	363 ± 11
MR + CaCO ₃	8,0	7,3	676 ± 13	540 ± 13

(1) : valeur corrigée à la température de 25 °C

(2) : $\Delta\sigma = \sigma_{\text{liqueur}} - \sigma_{\text{eau chauffée}}$

(3) : CaCl₂ Bas

(4) : CaCl₂ Haut

Les ions chlorure et sulfate n'ont aucun effet sur le pH qui est le même que dans le cas des eaux UP et MR. Par contre, la présence de carbonate de calcium augmente la capacité à neutraliser les acides de l'eau MR par le déplacement de l'équilibre 3.4 dans le sens de la

dissolution de la calcite avec libération de calcium et d'hydrogénocarbonate dans l'eau permettant ainsi de tamponner le pH à 7,3.

La conductivité des liqueurs de thé varie entre 649 et 1538 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Afin de comparer les différentes eaux entre elles, la valeur de conductivité de l'eau chauffée a été soustraite à celle de la liqueur correspondante. Il apparaît que l'augmentation de conductivité provoquée par l'extraction des composées ioniques est moins importante dans le cas des eaux fortement minéralisées comparée à l'eau UP. En tenant compte de l'équation 3.6 reliant la conductivité à la valeur absolue de la charge $|z_i|$ d'un ion i , λ_i° la conductivité molaire équivalente de i ($\text{S m}^2 \text{mol}^{-1}$) et $[X_i]$ sa concentration molaire (mol L^{-1}), cela signifie qu'il y a moins d'espèces ioniques sous une forme chargée en solution ou que les espèces présentes possèdent des conductivités molaires équivalentes plus faibles.

$$\sigma = \sum_i |z_i| \lambda_i^\circ [X_i] \quad \text{Eq. 3.6}$$

Les conductivités molaires équivalentes des ions majeurs sont données en Annexe 4.

Dans le cas des liqueurs de thé, la plus faible variation de conductivité peut être due à deux phénomènes, soit les espèces ioniques sont présentes à des concentrations plus faibles, soit elles sont complexées de manière plus importante avec la matière organique et contribuent donc plus ou moins à la conductivité. Cette hypothèse semble la plus vraisemblable car la minéralisation ne semble pas affecter l'extraction du potassium qui à lui seul représente une conductivité d'environ 370 $\mu\text{S cm}^{-1}$.

3.2.5.2. Extraction de la matière organique

3.2.5.2.1. Carbone organique dissous et polyphénols totaux

Le calcium étant connu pour être un facteur favorisant la formation de crème de thé et pouvant induire une élimination d'une partie du COD extrait lors de la filtration (Jöbstl *et al.*, 2005), deux analyses complémentaires de la matière organique ont été réalisées. Pour vérifier que la diminution du COD ou de la concentration en polyphénols totaux est bien due à une diminution d'extraction et non à une rétention sur les membranes lors de la filtration, le dosage des polyphénols totaux a été réalisé sans aucune filtration préalable par la méthode de Folin-Ciocalteu (cf. 2.3.2.1.4). Les résultats étant obtenus en mg éq AG L^{-1} et dans le but de

pouvoir les comparer aux valeurs de COD, les valeurs de polyphénols totaux ont été exprimées en mol C L^{-1} à l'aide de la relation 3.7 (Tableau 3.20) :

$$x = \frac{[TPC]}{M} \times 7 \quad \text{Eq. 3.7}$$

- avec
- x : concentration en polyphénols totaux en mol C L^{-1} ;
 - $[TPC]$: concentration en polyphénols totaux exprimée en g éq AG L^{-1} ;
 - M : $170,12 \text{ g mol}^{-1}$, masse molaire de l'acide gallique dont la formule brute est $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$;
 - 7 : facteur correctif pour tenir compte du nombre d'atomes de carbone dans l'acide gallique.

Tableau 3.20 : Concentrations en COD (mg C L^{-1}) et polyphénols totaux (mg éq AG L^{-1}) exprimées aussi en mol C L^{-1} . Rapport et différence entre les deux grandeurs en mol C L^{-1}

Eaux	COD ⁽¹⁾		TPC ⁽²⁾		Rapport TPC/COD	COD – TPC mol C L^{-1}
	mg C L^{-1}	mol C L^{-1}	mg éq AG L^{-1}	mol C L^{-1}		
UP	1780 ± 28	$0,148 \pm 0,002$	1244 ± 32	$0,051 \pm 0,001$	$0,35 \pm 0,01$	$0,097 \pm 0,003$
MR	1335 ± 57	$0,111 \pm 0,005$	1104 ± 54	$0,045 \pm 0,002$	$0,41 \pm 0,04$	$0,066 \pm 0,007$
Vi	1249 ± 20	$0,104 \pm 0,002$	708 ± 63	$0,029 \pm 0,003$	$0,28 \pm 0,03$	$0,075 \pm 0,005$
CaCl_2 B	1400 ± 100	$0,117 \pm 0,008$	761 ± 50	$0,031 \pm 0,002$	$0,27 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,01$
CaCl_2 H	–	–	657 ± 40	$0,027 \pm 0,002$	–	–
CaSO_4	1380 ± 40	$0,115 \pm 0,003$	723 ± 78	$0,030 \pm 0,003$	$0,26 \pm 0,04$	$0,085 \pm 0,006$
CaCO_3	1706 ± 34	$0,142 \pm 0,003$	1041 ± 32	$0,043 \pm 0,001$	$0,30 \pm 0,02$	$0,099 \pm 0,004$

(1) COD : carbone organique dissous

(2) TPC : concentration en polyphénols totaux

Comme dans le cas des eaux minérales naturelles, la teneur en COD des liqueurs préparées à partir d'eaux synthétiques diminue lorsque la teneur en calcium de l'eau augmente. Cependant, pour les eaux contenant des ions chlorure et sulfate, la teneur en COD est proche de celle observée dans le cas de l'eau MR tandis que la liqueur préparée avec l'eau contenant de la calcite contient une quantité de COD proche de celle préparée avec de l'eau UP. Les polyphénols représentent en moyenne 25 et 40 % de la matière organique extraite. De plus, les résultats confirment la diminution de l'extraction lorsque l'eau contient du calcium. Par ailleurs, il apparaît que la diminution de l'extraction des polyphénols est plus importante que pour le COD en règle générale. Cette différence pourrait provenir d'une modification de l'extraction des autres composés organiques présents dans les feuilles comme les protéines ou les polysaccharides comme les pectines puisque la différence COD – TPC varie également suivant les eaux utilisées.

3.2.5.2.2. Analyse des catéchines et de la caféine

Six polyphénols et deux alcaloïdes ont été analysés par HPLC-UV-MS après filtration des liqueurs à 0,45 μm . En complément, un des alcaloïdes, la caféine, a été dosé par RMN dans les liqueurs non filtrées (Tableau 3.21).

Tableau 3.21 : Quantification des catéchines et des polyphénols par HPLC-UV-MS après filtration à 0,45 μm et par RMN dans les liqueurs de thé M8

Eaux	Concentrations (mg L^{-1})							CAF	
	AG	C	EC	EGC	ECG	EGCG	TB	HPLC	RMN
UP	89 ⁽¹⁾	29 ⁽¹⁾	44 ⁽¹⁾	80 ⁽¹⁾	176 ⁽¹⁾	547 ⁽¹⁾	27 ⁽¹⁾	416 \pm 25	480 \pm 20
MR	71	19 ⁽¹⁾	25,5 ⁽¹⁾	82 ⁽¹⁾	92 ⁽¹⁾	369 ⁽¹⁾	18 ⁽¹⁾	389 \pm 20	409 \pm 28
Vi	39-70 ⁽²⁾	7-50 ⁽²⁾	17 ⁽¹⁾	13-55 ⁽²⁾	52-86 ⁽²⁾	40-133 ⁽²⁾	12 ⁽¹⁾	348 \pm 40	370 \pm 20 ⁽³⁾
CaCl ₂ B	66 ⁽¹⁾	50 ⁽¹⁾	38 ⁽¹⁾	88 ⁽¹⁾	208 ⁽¹⁾	302 ⁽¹⁾	22 ⁽¹⁾	345 \pm 40	333 \pm 18
CaCl ₂ H	50 ⁽¹⁾	18,5 ⁽¹⁾	32 ⁽¹⁾	54 ⁽¹⁾	74 ⁽¹⁾	257 ⁽¹⁾	16 ⁽¹⁾	314 \pm 50	323 \pm 10
CaSO ₄	74 ⁽¹⁾	13 ⁽¹⁾	29 ⁽¹⁾	37-108 ⁽²⁾	93 ⁽¹⁾	245 ⁽¹⁾	17 ⁽¹⁾	330 \pm 30	–
CaCO ₃	117 ⁽¹⁾	80 ⁽¹⁾	51 ⁽¹⁾	80-120 ⁽²⁾	141 ⁽¹⁾	184-351 ⁽²⁾	24 ⁽¹⁾	400 \pm 30	–

(1) : moyenne sur deux points obtenus par injection de deux liqueurs – écart < 10 %

(2) : deux valeurs obtenues par injection de deux fractions ultrafiltrées de deux liqueurs différentes

(3) : Pour cet échantillon préparé avec Vi, le lyophilisat ne s'est pas totalement dissous après reprise dans D₂O. La concentration en caféine obtenue dans le surnageant était de 350 mg L^{-1} . Le surnageant a alors été retiré pour reprendre le culot dans un second volume de D₂O. Le résultat obtenu conduit à une concentration totale dans la liqueur de 370 mg L^{-1} . Après une troisième reprise du culot, aucune trace de caféine n'a été décelée.

L'analyse des polyphénols dans le cas des eaux Vi et MR + CaCO₃ a montré de grandes différences entre les deux liqueurs réalisées. En effet, dans l'une des liqueurs, les résultats sont inférieurs de 50 à 70 % par rapport à l'autre. Ces différences pourraient être dues à un problème de cinétique de dégradation des composés entre la réalisation de la liqueur et l'analyse, les catéchines étant moins stables en milieu basique. Globalement, l'extraction de l'EGCG est la plus significativement modifiée par la composition de l'eau puisque sa concentration diminue de 76 % dans l'eau Vi par rapport à l'eau UP. De même pour la caféine qui diminue de 33 % entre l'eau UP et l'eau MR + CaCl₂ H. De plus, les résultats des analyses par HPLC-UV-MS et par RMN concernant la caféine sont en accord en tenant compte des incertitudes. Cependant, nous pouvons noter que la valeur en RMN est supérieure d'environ 15 % à celle de l'HPLC pour l'eau UP avec un effet possible de la filtration par élimination d'une partie de la crème.

Dans le but d'étudier le fractionnement des molécules organiques, les liqueurs ont été ultrafiltrées à 100, 30 et 5 kDa. Les durées de filtration varient en fonction de la liqueur et aussi du seuil de coupure de la membrane (Tableau 3.22).

Tableau 3.22 : Durée de filtration d'un volume de 40 mL des différentes liqueurs de thé M8 en fonction du seuil de coupure

Eau	Durée de filtration (min) en fonction des seuils de coupure		
	100 kDa	30 kDa	5 kDa
UP	45	40	240
MR	80	60	200
Vi	120	230	380
CaCl ₂ B	60	80	250
CaCl ₂ H	60	90	290
CaSO ₄	90	150	280
CaCO ₃	190	100	260

Globalement, le temps de filtration augmente lorsque le seuil de coupure diminue à l'exception de l'eau MR + CaCO₃. Dans le cas de cette eau, la grande variation entre les fractions à 100 et à 30 kDa est sans doute due à la présence de la calcite qui ralentit le processus de filtration sur la membrane à 100 kDa. La durée de filtration la plus longue a été observée dans le cas de l'eau Vi, montrant la présence de plus de matière sous forme colloïdale. Les résultats des dosages des six polyphénols et des deux alcaloïdes sont reportés dans le Tableau 3.23.

Tableau 3.23 : Concentrations en polyphénols totaux, catéchines et alcaloïdes au sein des fractions ultrafiltrées des liqueurs de thé M8 en fonction de l'eau utilisée

Eau	Seuil de coupure (kDa)	TPC (mg éq. AG L ⁻¹)	AG	C	EC	ECG	EGC	EGCG	TB	CAF
UP	100	1152 ± 32	88	27	44	193	81	556	27	422
	30	1143 ± 35	88	26	43	191	80	547	27	416
	5	1007 ± 10	83	22	38	172	74	531	27	388
MR	100	794 ± 34	69	22	27	91	70	297	17	379
	30	862 ± 64	70	22	27	92	69	291	17	367
	5	751 ± 35	62	14	19	70	62	254	15	328
Vi	100	516 ± 9	64	18-48	23	50-67	17-49	11	16	331
	30	228 ± 20	24	12-6	12	11-17	13-37	3	12	273
	5	< LD ⁽¹⁾	2	2-5	4	< LD ⁽¹⁾	< LD ⁽¹⁾	< LD ⁽¹⁾	10	218
CaCl ₂ B	100	817 ± 63	66	60	37	236	84	278	22	374
	30	744 ± 15	67	51	36	195	89	279	22	351
	5	576 ± 8	63	38	30	158	78	257	21	316
CaCl ₂ H	100	804 ± 17	51	19	33	74	54	242	16	319
	30	862 ± 64	52	19	33	77	57	242	17	313
	5	705 ± 14	51	10	27	57	56	226	16	292
CaSO ₄	100	700 ± 13	75	22	31	98	29-116	256	17	336
	30	662 ± 23	74	20	30	91	34-113	253	16	325
	5	544 ± 27	72	16	29	67	33-107	218	16	288
CaCO ₃	100	1019 ± 33	116	83	58	135	56-90	96-131	24	414
	30	880 ± 28	111	93	56	120	59	75-88	24	373
	5	560 ± 15	93	46	41	70	53	20-59	21	316

(1) : valeur inférieure à la limite de détection

L'ensemble de ces résultats montre que l'eau Vi est celle qui influence le plus la complexation des molécules. En effet après filtration à 5 kDa, la teneur en polyphénols totaux est inférieure à la limite de détection. Par ailleurs, la présence de calcium libre induit une diminution des concentrations par rapport à l'eau UP mais cette diminution est beaucoup moins importante que dans le cas de l'eau Vi.

3.2.5.3. *Extraction de la matière minérale*

Pour cette étude, les minéralisations ont été réalisées en présence d'acide fluorhydrique pour permettre la dissolution de la silice pouvant être présente dans les feuilles ou les liqueurs. Les rendements d'extraction avec ou sans acide fluorhydrique ne montrent aucune différence significative (Tableau 3.24).

Tableau 3.24 : Rendements d'extraction avec ou sans HF pour les eaux UP et Vi avec le thé M8

Liqueurs		Rendement d'extraction (%)					
		Ca	K	Mg	Al	Fe	Mn
UPM8	sans HF	2,4 ± 0,5	47 ± 5	25 ± 2	11,1 ± 0,7	12 ± 3	12 ± 1
	avec HF	2,4 ± 0,6	49 ± 6	21 ± 2	12 ± 1	13 ± 3	11 ± 2
ViM8	sans HF	n.m.	49 ± 6	12 ± 3	7,2 ± 0,8	9 ± 1	7,7 ± 0,6
	avec HF	n.m.	51 ± 5	11 ± 2	8 ± 1	11 ± 2	7,6 ± 0,7

(1) : non mesurable

Les concentrations des éléments minéraux dans les différentes liqueurs préparées avec les eaux synthétiques sont reportées dans le Tableau 3.25.

Tableau 3.25 : Concentrations (mg L⁻¹) des éléments inorganiques dans les liqueurs de thé M8 après minéralisation et analyse par ICP-AES

Eau		Concentration en éléments mg L ⁻¹						
	Ca dans l'eau (mg L ⁻¹)	Ca	Al	Fe	K	Mg	Mg apport	Mn
UP	–	2,6 ± 0,3	2,5 ± 0,3	1,6 ± 0,2	205 ± 2	11,8 ± 0,7	9 ± 1	2,0 ± 0,2
MR	1,4 ± 0,1	5,8 ± 0,5	2,5 ± 0,3	1,6 ± 0,2	206 ± 13	12 ± 1	11,7 ± 1	2,2 ± 0,1
Vi	151 ± 8	160 ± 5	1,6 ± 0,2	1,13 ± 0,09	201 ± 3	52 ± 1	5,(5) ± 2	1,3 ± 0,1
CaCl ₂ B	168 ± 9	117 ± 7	1,3 ± 0,3	0,90 ± 0,06	226 ± 13	8,5 ± 0,4	7,7 ± 0,4	1,3 ± 0,1
CaCl ₂ H	197 ± 3	168 ± 6	1,6 ± 0,2	0,86 ± 0,05	203 ± 5	10,1 ± 0,3	9,3 ± 0,4	1,3 ± 0,1
CaSO ₄	216 ± 1	180 ± 11	1,4 ± 0,2	1,08 ± 0,07	194 ± 8	9,4 ± 0,7	8,6 ± 0,7	1,51 ± 0,08
CaCO ₃	225 ± 7	229 ± 17	2,8 ± 0,3	1,6 ± 0,1	220 ± 15	11,1 ± 0,6	10,3 ± 0,6	1,87 ± 0,05

Les résultats sont en accord avec ceux des liqueurs préparées avec des eaux minérales naturelles : l'extraction de l'aluminium, du fer et du manganèse diminue lorsque la concentration en calcium dans l'eau augmente.

Concernant le magnésium, l'effet du calcium semble moins important. La diminution de la concentration en calcium dans les liqueurs après infusion dans une eau chargée en calcium est démontrée. L'eau MR + CaCO₃ est un cas particulier car le calcium est majoritairement

présent sous forme de calcite et donc ne semble pas disponible pour la sorption au niveau des feuilles. Dans ce cas, l'extraction ne semble pas non plus significative.

3.2.5.4. Formation de colloïdes

Nous avons vu précédemment que le calcium possède un effet sur l'extraction des composés à partir des feuilles. D'après les études bibliographiques, il pourrait favoriser la formation de la crème en neutralisant les charges électrostatiques de surface. Dans l'objectif de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué les mesures du potentiel zêta (ζ) qui permet d'évaluer en fonction du pH des solutions et de la force ionique, la charge apparente des particules en suspension.

3.2.5.4.1. Charge des colloïdes

Les eaux témoins

Seule l'eau MR + CaCO_3 possédait des particules suffisamment grosses pour permettre la mesure. Le domaine de pH couvert a été de 6 à 11 car pour les pH inférieurs à 6, les mesures deviennent impossibles à cause de la dissolution de la calcite. Les résultats obtenus le jour de la préparation de l'eau (jour J) et le lendemain (jour J + 1) sont présentés dans la Figure 3.14 et comparés à ceux de la littérature.

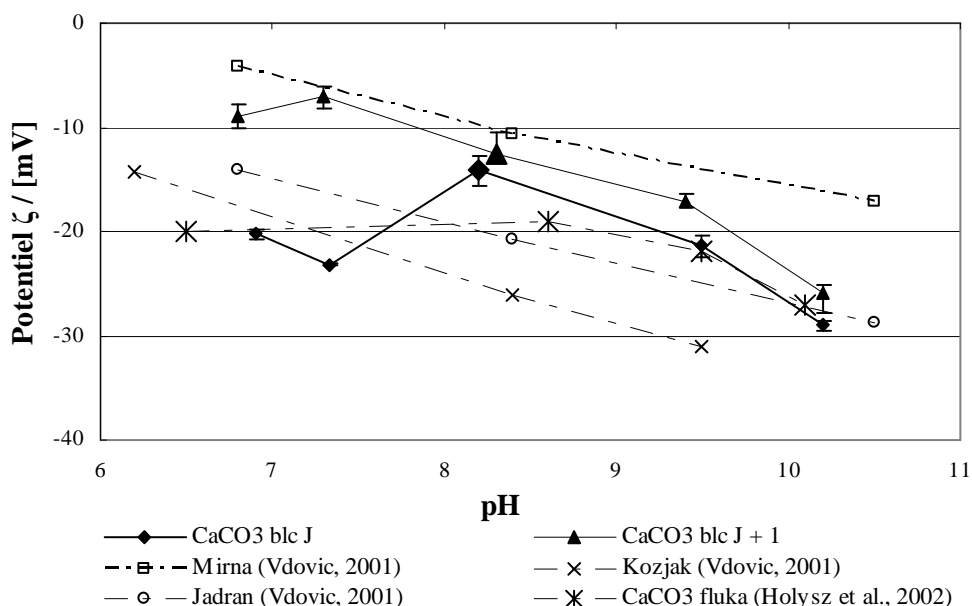


Figure 3.14 : Variations du potentiel ζ du CaCO_3 en solution dans l'eau Mont-Roucoux comparées aux valeurs de la littérature

Dans tous les cas, les potentiels ζ de la calcite sont négatifs. Des différences de comportement sont observées entre les solutions à J et J + 1. La variation du potentiel ζ à J + 1 est similaire à celle des calcites étudiées dans la littérature (Vdovic, 2001; Holysz *et al.*, 2002). Au point d'équilibre de la calcite avec le CO₂ de l'air, le potentiel est de -12,6 mV et dans le domaine de pH 6,80 à 10,20, il varie de -8,90 à -25,80 mV. Dans notre cas, la dissolution de la calcite, dans une eau de force ionique 0,30 mmol L⁻¹ ne semble pas modifier les résultats comparés à ceux de la littérature dont la dissolution était réalisée dans une solution à 1 mmol L⁻¹ (NaCl). Pour la solution analysée le jour J, nous observons une diminution en valeur absolue du potentiel dès l'ajout d'acide. Cette variation peut être due au non-équilibre avec l'eau et la phase gazeuse en contact.

Ainsi le pH est de 8,2, valeur inférieure au pH à l'équilibre qui est théoriquement de 8,3 (Sigg *et al.*, 2000). L'ajout de l'acide a donc pour conséquence de déplacer l'équilibre vers des pH plus acides, ce qui peut conduire à une dissolution rapide d'une partie de la calcite. Or, lors de la dissolution de la calcite, il semblerait que la surface perde plus de sites $\equiv\text{CaOH}_2^+$ que de sites $\equiv\text{CO}_3^-$, la conséquence étant une surface chargée plus négativement (Stipp & Hochella, 1991; Vdovic, 2001). Lors des ajouts suivants, la surface tend à retrouver le potentiel initial.

Les liqueurs de thé

Pour les mesures de potentiel ζ , la gamme de pH étudiée varie de 1 à 12. Les pH acides sont atteints par ajouts d'acide nitrique et les pH basiques par ajout de soude. Les résultats concernant la liqueur préparée avec l'eau UP sont en accord avec ceux de la littérature bien que les essais dans ce dernier cas aient été réalisés sur une liqueur dialysée diluée (Harbron *et al.*, 1989) (Figure 3.15). La valeur du potentiel ζ diminue lors de l'ajout d'acide et augmente lors de l'ajout de base avant de se stabiliser pour les valeurs de pH comprises entre 6 et 8. Pour les valeurs de pH supérieures à 9, l'incertitude grandit. Il semblerait que les particules contrôlant la mesure du potentiel ζ deviennent solubles et que la valeur mesurée corresponde au potentiel des particules insolubles telles que les fibres des feuilles (Harbron *et al.*, 1989). L'intensité du signal donne une indication sur la quantité de particules présentes en solution, l'intensité augmentant avec la quantité. Or, nous observons bien une diminution de l'intensité du signal pour les pH supérieurs à 9 tendant à montrer la solubilisation des particules (Figure 3.15).

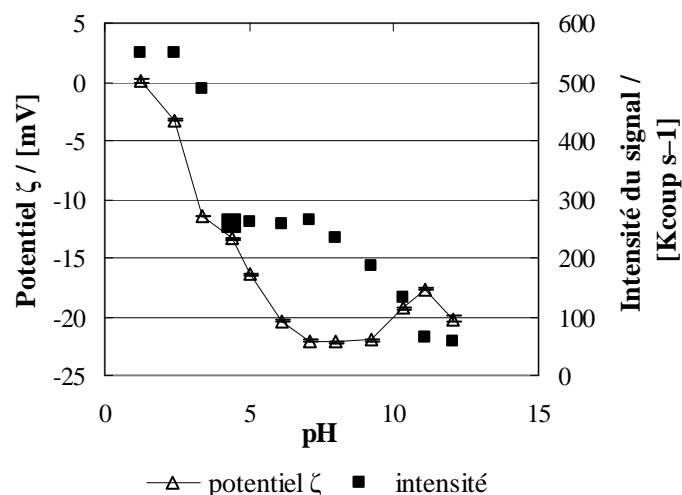


Figure 3.15 : Potentiel ζ des particules dans la liqueur réalisée avec l'eau UP et intensité du signal correspondant. Les points de plus grande taille représentent les liqueurs sans ajustement de pH

Aux pH inférieurs à 4, le nombre de coups augmente. Ceci indique que les particules de thé sont de moins en moins solubles et tendent à précipiter (Figure 3.16), comportement analogue à celui des acides humiques des eaux naturelles. A partir de ces résultats, nous pouvons estimer que les fonctions carboxyliques et phénoliques pourraient représenter chacune en moyenne entre 2 et 6 mmol g⁻¹ (Sigg *et al.*, 2000).

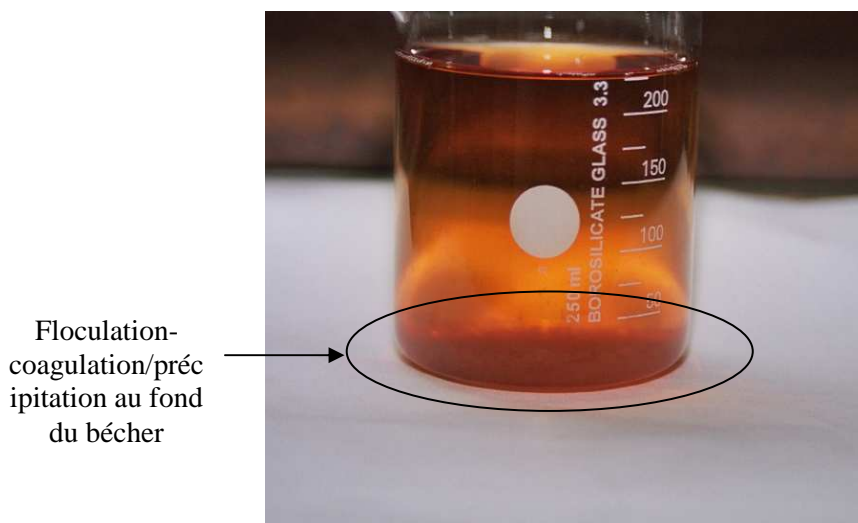


Figure 3.16 : Liqueur UPM8 avec présence d'un précipité au fond du b cher (pH ajusté   1 par ajout d'acide nitrique)

Les ajouts d'acide ou de base entraînent une augmentation de la force ionique des solutions. Cette augmentation est de 0,136 mol L⁻¹ lors de l'ajout de l'acide. Afin de contrôler son

influence, la force ionique des liqueurs préparées avec les eaux UP et MR a été fixée à $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ par ajout de NaNO_3 avant analyse. Dans ce cas, la variation de la force ionique n'est au maximum que de $+9,2 \%$. L'incertitude des mesures est plus grande du fait de la présence des ions qui déstabilisent les particules et rendent le signal plus instable (Patrice Bacchin, communication personnelle). Les liqueurs préparées avec les eaux UP et MR conduisent à des résultats similaires (Figure 3.17). Deux zones peuvent être observées : (I) pour les valeurs de pH comprises entre 5 et 10, les potentiels dans la liqueur à force ionique fixée sont moins négatifs, environ 5 mV , que ceux dans la liqueur initiale ; (II) pour les pH extrêmes, *i.e.* $\text{pH} < 5$ et $\text{pH} > 10$, le phénomène inverse se produit.

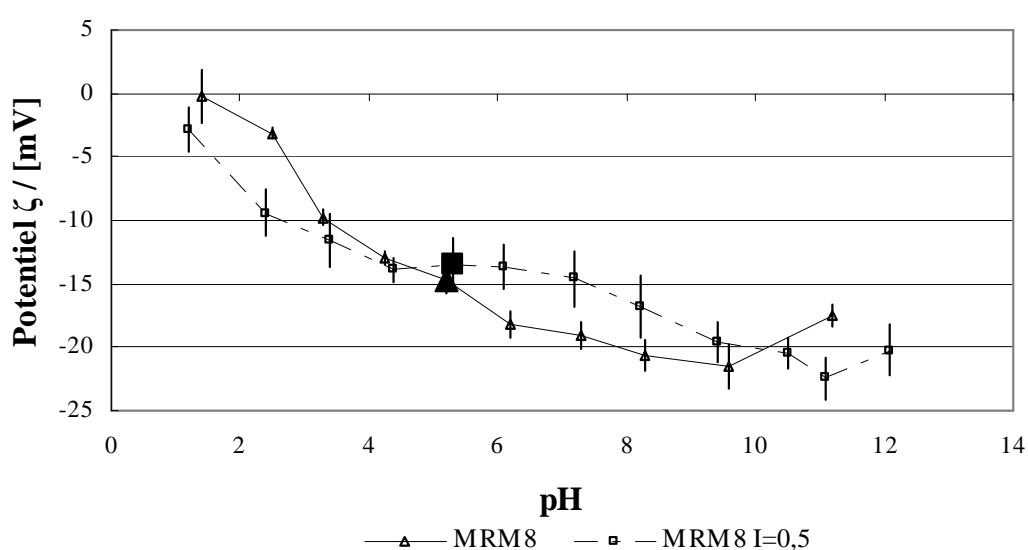


Figure 3.17 : Variation du potentiel ζ en fonction du pH dans la liqueur MRM8 et dans cette même liqueur avec la force ionique fixée à $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Les points de plus grande taille représentent les liqueurs sans ajustement de pH

Les liqueurs préparées par ajout de CaCO_3 constituent un cas particulier puisque avant infusion l'eau contient déjà des particules chargées. La liqueur analysée possède donc des particules colloïdales chargées plus négativement que la calcite seule (Figure 3.18). Cette variation est sans doute due à l'adsorption des molécules organiques de type polyphénols à la surface des particules comme cela se produit dans les eaux naturelles où la charge de surface de la calcite est contrôlée par les polymères organiques (Vdovic & Biscan, 1998).

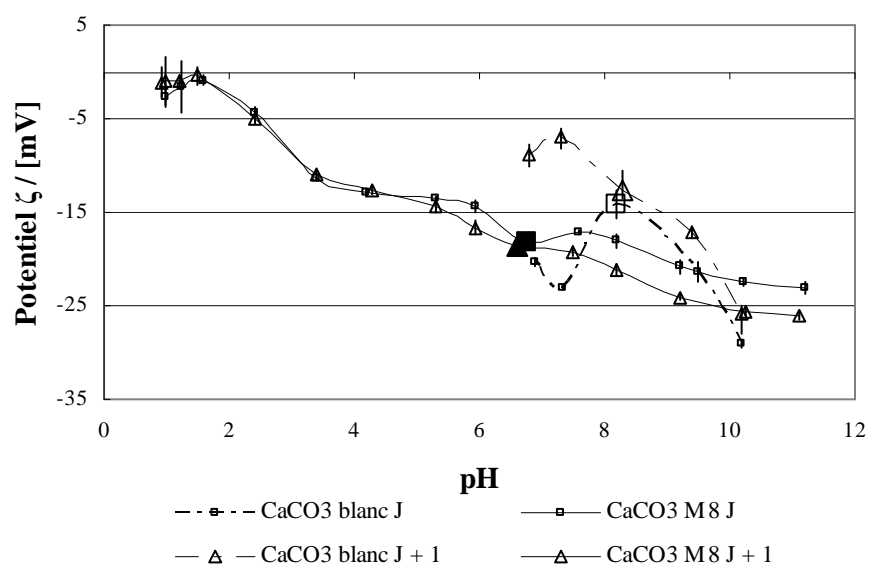


Figure 3.18 : Comparaison des potentiels ζ mesurés pour la calcite seule (MR + CaCO_3) le jour de la préparation (CaCO_3 blanc J), de la calcite seule le lendemain de sa préparation (CaCO_3 blanc J+1) et des liqueurs de thé M8 préparées le jour J puis analysées à J et J+1. Les points de plus grande taille représentent les liqueurs sans ajustement de pH

Pour les autres ajouts de calcium, deux liqueurs pour chacune des eaux ont été analysées. Une bonne reproductibilité des résultats a été observée (Figure 3.19).

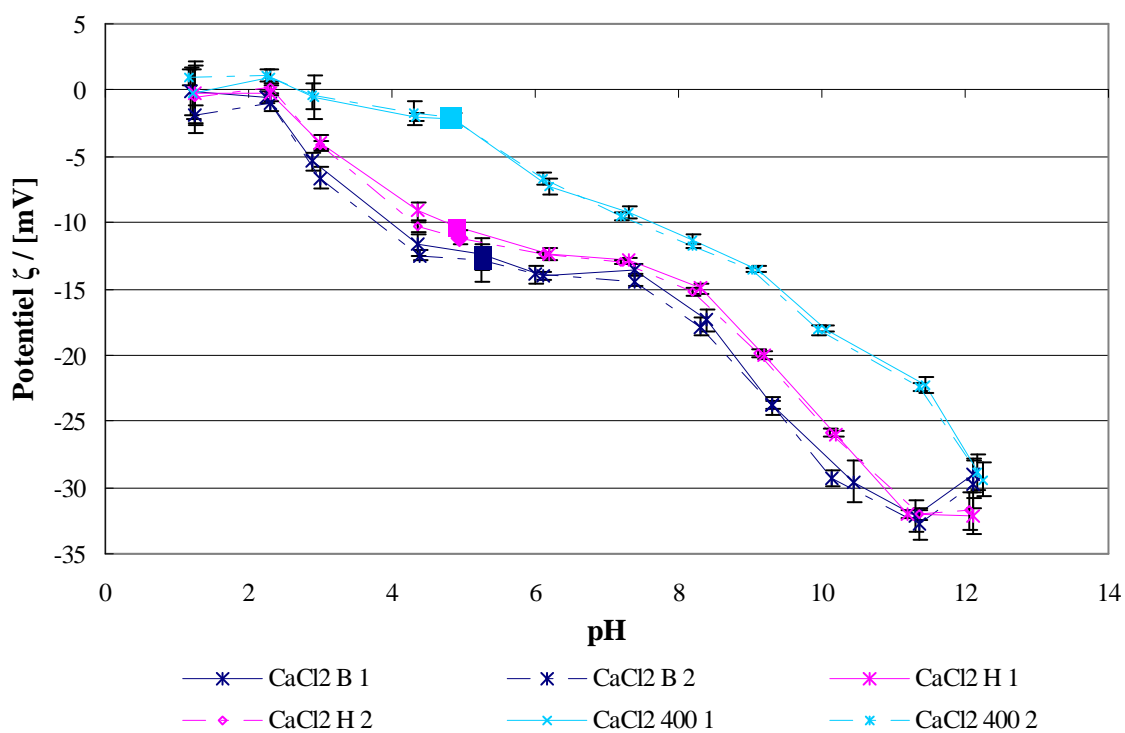


Figure 3.19 : Évolution du potentiel ζ en fonction de la teneur en CaCl_2 pour les duplicats. Les points de plus grande taille représentent les liqueurs sans ajustement de pH

Sur la Figure 3.19, nous pouvons observer que, lorsque la concentration en CaCl_2 augmente, la valeur absolue du potentiel ζ diminue, phénomène existant sur toute la gamme de pH.

Les résultats obtenus à l'aide des liqueurs préparées avec des eaux synthétiques avec ajout de CaCl_2 200 et CaSO_4 (Figure 3.20) ont des profils de comportement très similaires. Ceci confirme que le contre-ion dans ce système a peu d'influence sur la charge des particules. De plus, aux pH initiaux des liqueurs, les particules ont toujours des valeurs de potentiel supérieures à -30 mV. Les colloïdes sont alors instables et vont avoir tendance à flocculer (Malvern Instruments).

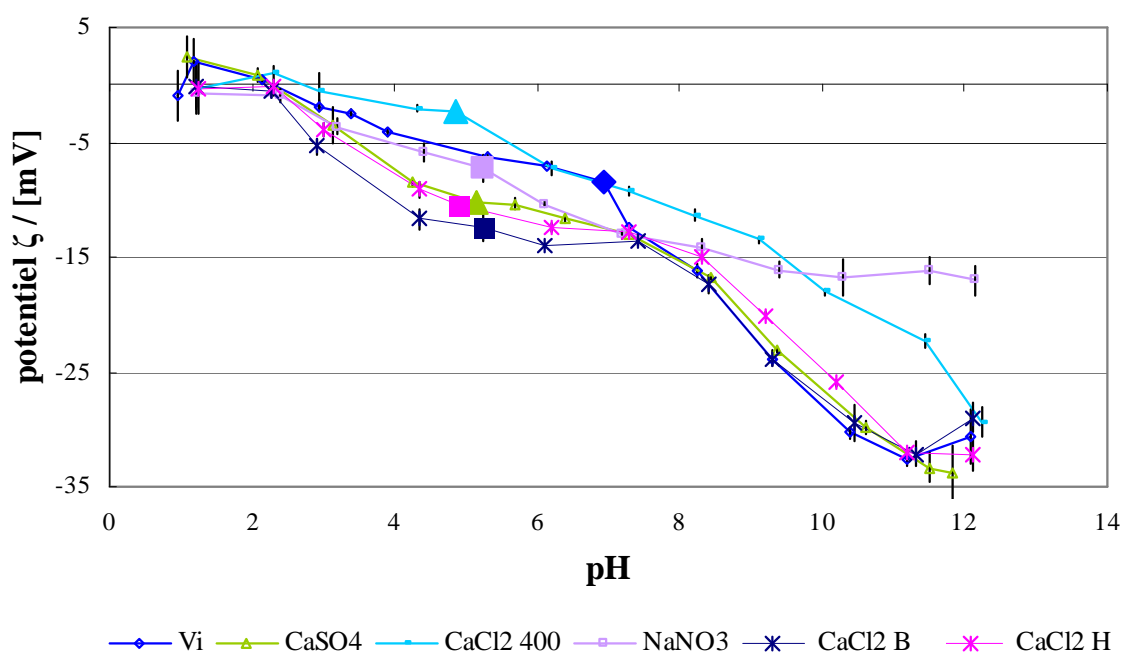


Figure 3.20 : Variation du potentiel ζ des liqueurs ayant une force ionique élevée. Les points de plus grande taille représentent les liqueurs sans ajustement de pH

Les différents comportements caractéristiques des liqueurs préparées avec une eau peu minéralisée (UP), une eau contenant uniquement du calcium (CaCl_2 H), une eau minéralisée avec prédominance d'un système calco-carbonique (Vi) ou une eau possédant une force ionique élevée en absence de calcium sont résumés dans la Figure 3.21.

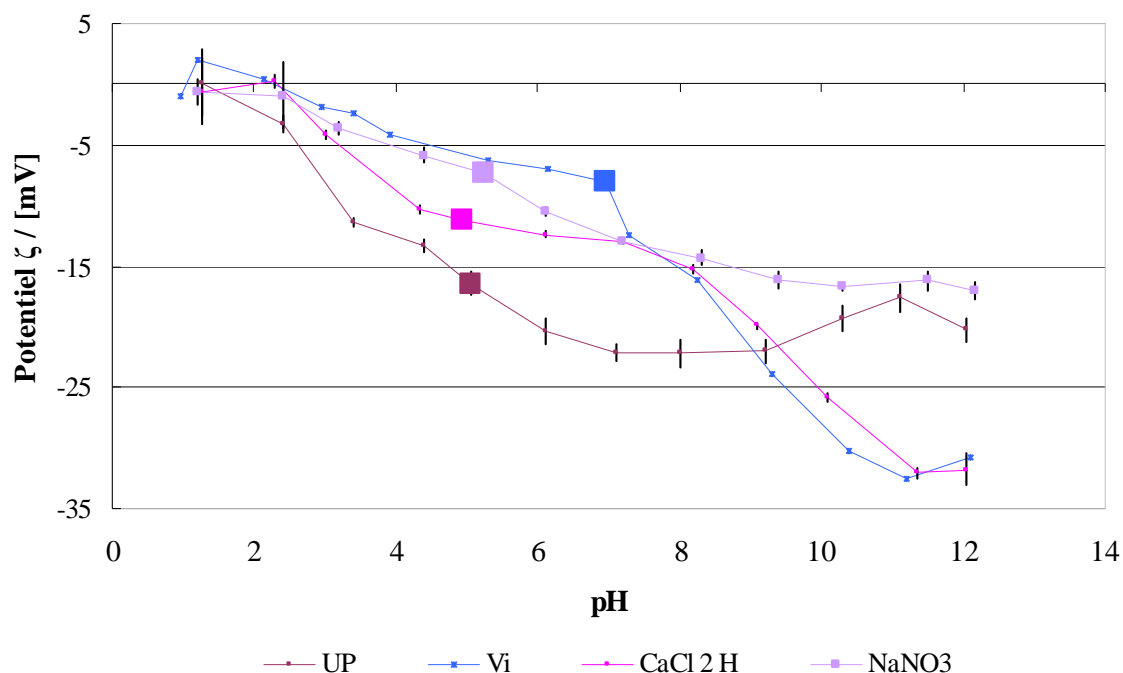


Figure 3.21 : Courbes de variation du potentiel ζ en fonction du pH caractéristiques des eaux non minéralisée (UP), contenant du calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}$), contenant un système calco-carbonique (Vi) et possédant une force ionique élevée mais en absence de calcium (NaNO_3). Les points de plus grande taille représentent les liqueurs sans ajustement de pH

HNO_3

Lorsque le pH est supérieur à 8, le potentiel ζ des colloïdes présents dans les liqueurs contenant du calcium diminue fortement lors de l'ajout d'acide. Ce comportement ne peut être attribué à la force ionique car la liqueur préparée avec l'eau MR + NaNO_3 a un comportement plus proche de la liqueur préparée avec l'eau UP. De plus, en présence de calcium, les particules flocculent plus rapidement que dans l'eau UP comme le montrent les photos des différentes liqueurs (Figure 3.22). À pH 10,3 dans le cas de la liqueur préparée avec l'eau UP, l'hélice d'agitation est encore visible alors que cela n'est plus le cas pour la liqueur préparée avec l'eau MR + $\text{CaCl}_2 \cdot 400$. Le changement de couleur est dû d'une part à l'oxydation des polyphénols et à la dissociation des théaflavines et des théarubigines dont les anions ont des couleurs plus sombres que les formes non dissociées et d'autre part à la déprotonation des acides faibles (Roberts & Smith, 1963; Liang & Xu, 2001).

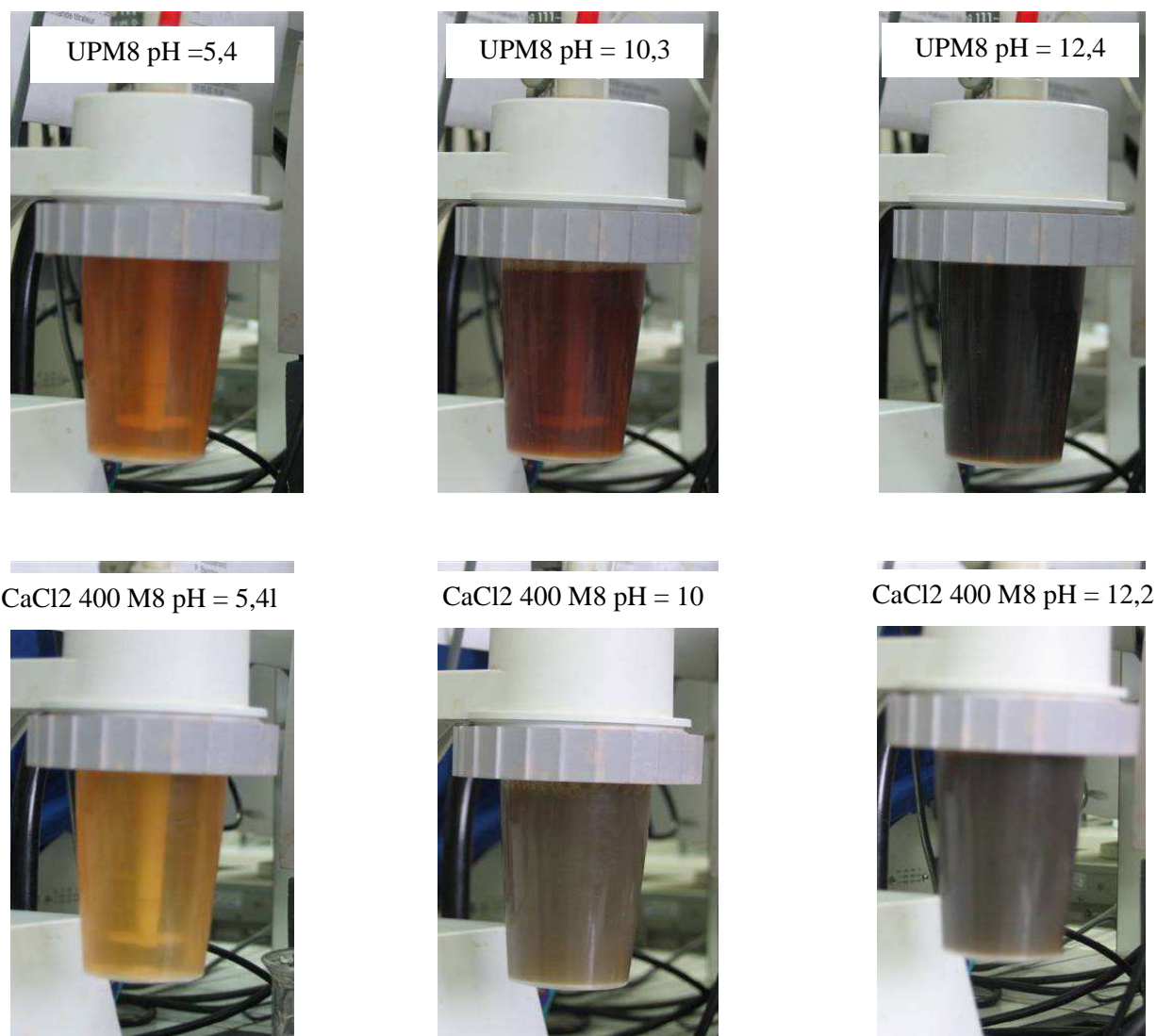


Figure 3.22 : Évolution de l'apparence des liqueurs UPM8 et CaCl₂ 400 M8 lors de l'augmentation du pH pour l'obtention des courbes représentées dans la Figure 3.21

Le cas de l'eau Vi est particulièrement intéressant puisqu'au pH initial de la liqueur, les colloïdes présents en solution possèdent la même charge de surface que ceux dans l'eau MR + CaCl₂ 400 après ajustement au même pH. Or, dans le reste de la gamme de pH, les deux liqueurs ont des comportements très différents. Ainsi, le comportement des colloïdes présents dans l'eau Vi peut être modélisé par trois eaux différentes suivant le domaine de pH considéré :

- l'eau MR + NaNO₃ pour les pH acides < à 5 ;
- l'eau MR + CaCl₂ 400 pour les pH compris entre 5 et 8 ;
- l'eau MR + CaCl₂ 200 pour les pH supérieurs à 8.

Quelle que soit l'eau utilisée pour préparer la liqueur, il n'apparaît pas clairement de point isoélectrique. Cependant, le potentiel ζ diminue fortement en tendant vers zéro aux alentours de pH 2 sans qu'aucune inversion franche du signe ne soit observée. Ce phénomène est cohérent avec les données de la littérature (Penders *et al.*, 1998b). Ceci indiquerait que les sites responsables de la charge des particules du thé sont constitués par des sites monofonction comme les sites carboxyliques (Hunter, 1981). Dans le cas des liqueurs de thé, il s'agit des fonctions hydroxyles des polyphénols qui sont en partie dissociées au pH des liqueurs.

Dans la gamme de pH et de concentration en calcium étudiée, le potentiel ζ des liqueurs varie linéairement avec l'ajout de calcium en ne considérant que les liqueurs ayant toutes un pH initial de 5,4 (Figure 3.23).

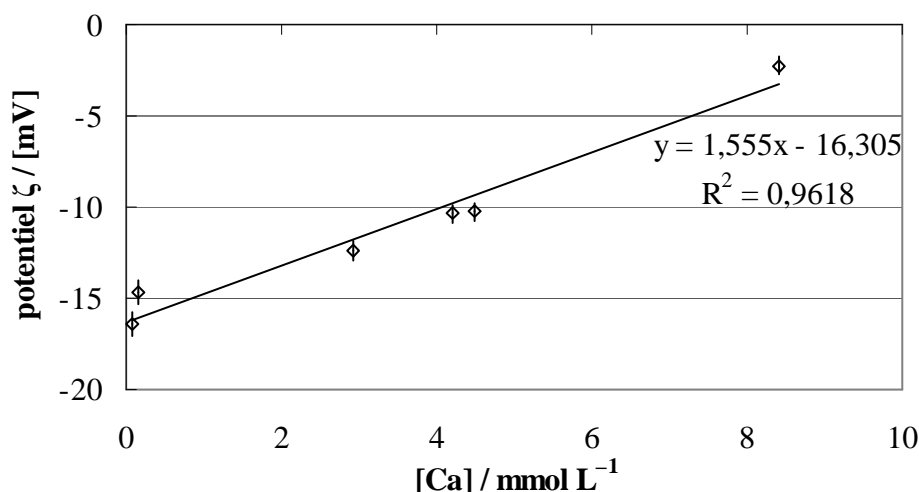


Figure 3.23 : Variation du potentiel ζ en fonction de la concentration en calcium pour les liqueurs avec les eaux UP, MR, MR + CaCl₂ B, MR + CaCl₂ H, MR + CaSO₄ et MR + CaCl₂ 400

Cette relation est contraire à celle montrée par Harbron (1989) qui avait conclu à une dépendance logarithmique entre le potentiel ζ et la concentration en calcium. Ceci pourrait être dû au fait que Harbron (1989) avait préparé la liqueur différemment : une première liqueur était préparée par extraction à l'eau chaude à contre courant, cette liqueur étant ensuite concentrée et atomisée. Les particules obtenues ont ensuite été solubilisées dans de l'eau à 95 °C durant 30 min. Cette solution a été analysée après dialyse et dilution par 67. Or, une étude sur le café (Dupas *et al.*, 2006) a montré d'une part que la teneur en polyphénols est inférieure dans les particules après atomisation et d'autre part que cette étape renforce les liaisons entre les polyphénols et les protéines favorisant ainsi leur co-précipitation. Les

polyphénols sont considérés comme les principaux composés contrôlant le potentiel ζ , l'atomisation a pour conséquence de diminuer la quantité de sites actifs. De ce fait, les charges de surfaces sont saturées pour des valeurs de calcium ajouté plus faibles dans le travail de Harbron (1989) que dans notre travail.

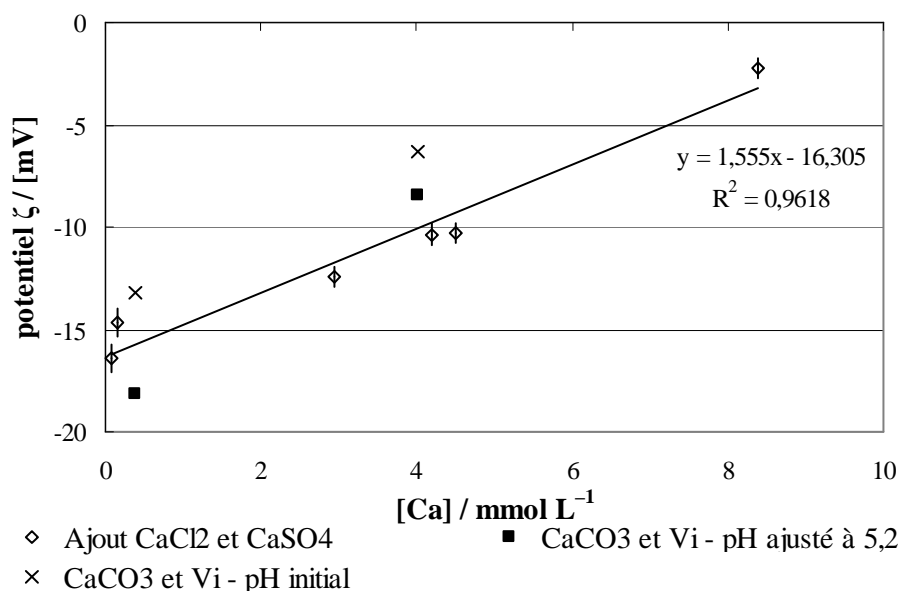


Figure 3.24 : Variation du potentiel ζ en fonction de la teneur en calcium et comparaison avec les eaux Vi et CaCO₃

Nous pouvons observer que, pour des teneurs en calcium similaires, la liqueur préparée avec l'eau Vi ne se situe pas sur la droite que ce soit au pH initial ou après ajustement à 5,2 (Figure 3.24). Ce résultat pourrait être dû au fait que les sites négatifs sont moins nombreux, expliquant ainsi la diminution de l'extraction des polyphénols. L'ajout de calcium neutraliserait donc les charges négatives des polyphénols. D'après Harbron (1989), la concentration critique en calcium pour la coagulation, visible au bout de 4 h, serait de 160 mg L⁻¹ à un pH de 5,0, les particules présentes dans ces conditions ayant un potentiel de -8,1 mV. À l'exception du pH, ces conditions sont en fait celles obtenues dans le cas de la liqueur préparée avec l'eau Vittel. Par ailleurs, pour la liqueur préparée avec CaCl₂, le potentiel ζ des particules est plus élevé en valeur absolue, alors qu'il devrait être au point de coagulation critique.

La suite de l'étude a permis d'évaluer la réversibilité du processus. Ainsi, après diminution du pH initial jusqu'à 1, celui-ci a été augmenté jusqu'à 12 et inversement. L'observation visuelle a montré que la couleur obtenue n'est pas identique à la couleur initialement observée (Figure

3.25) ce qui tend à montrer que les colloïdes subissent des transformations irréversibles lors des ajouts de pH.

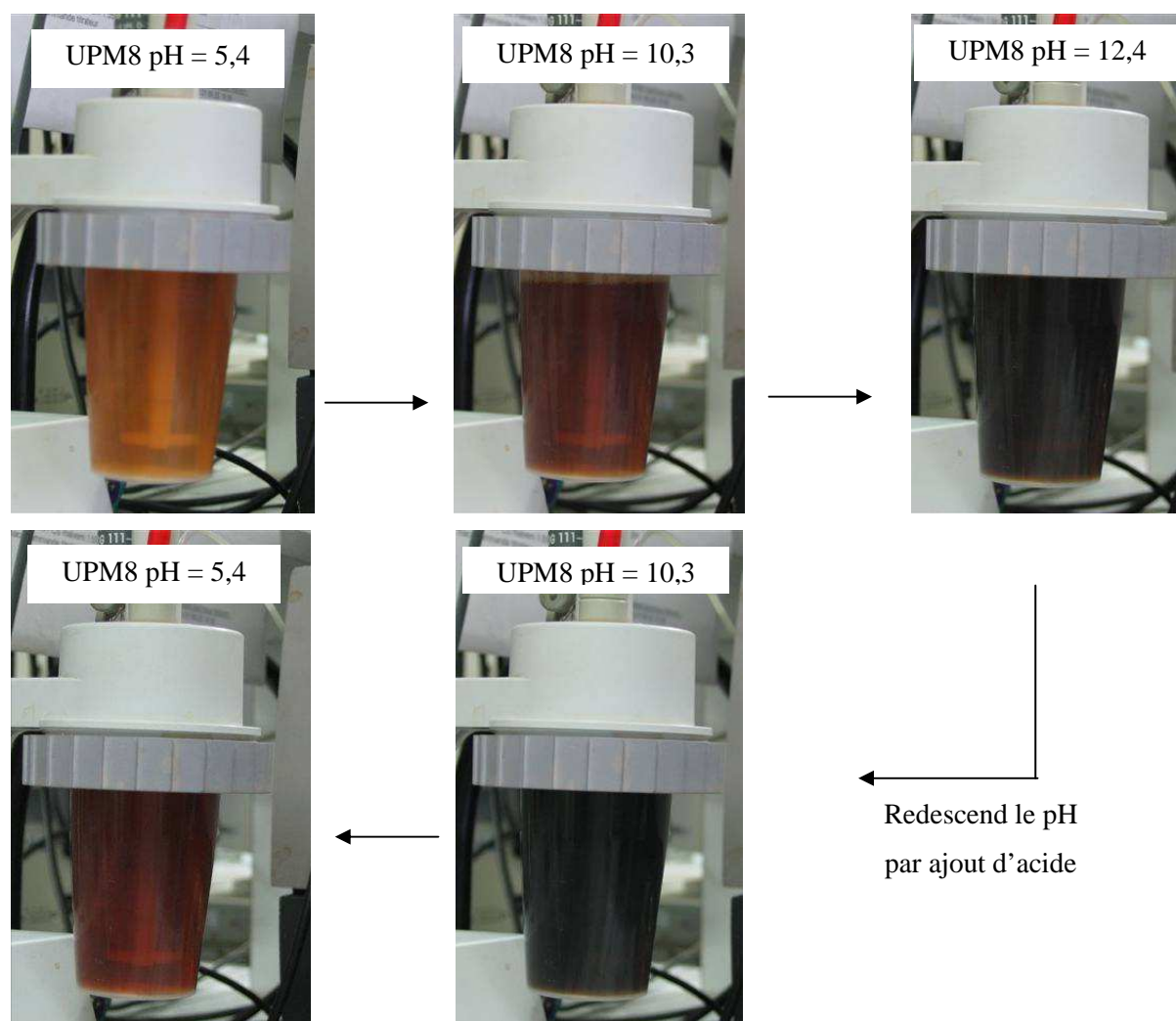


Figure 3.25 : Modification de la couleur des liqueurs de thé UPM8 après ajustement du pH à 12 et redescende à 5,4

3.2.5.4.2. Interaction entre les molécules organiques

L'étude des interactions entre les différentes molécules organiques en fonction de l'eau utilisée a été conduite par analyse RMN en *excitation sculpting*. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la variation du déplacement chimique de la caféine. Tout d'abord, l'influence des différentes eaux et des différents pH sur les déplacements chimiques a été contrôlée par analyse de caféine seule dissoute à 300 et 600 mg L⁻¹ dans les eaux UP, MR, MR + CaCl₂ B, MR + CaCl₂ H et Vi après ajustement du pH à 5, 7 et 8. La moyenne des résultats est présentée dans la Figure 3.26 avec l'erreur relative sur l'ensemble des analyses.

L'écart type, assez élevé, est dû à la capacité de la caféine à former des dimères ou trimères (Charlton *et al.*, 1999).

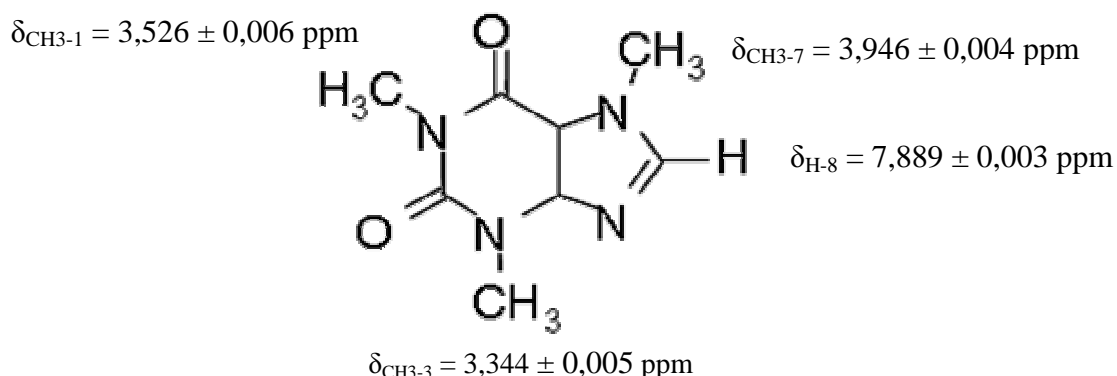


Figure 3.26 : Déplacement chimique des pics de la caféine seule pour 300 et 600 mg L⁻¹ dans les eaux UP, MR, MR + CaCl₂ B, MR + CaCl₂ H et Vi, pour les différents pH (référence $\delta_{\text{TMS}} = 0 \text{ ppm}$)

Par la suite, les déplacements chimiques de la caféine ont été déterminés dans trois liqueurs différentes puis comparés, suivant l'exemple montré ci-dessous pour le proton H-8 (Figure 3.27), à ceux obtenus pour la caféine seule (Tableau 3.26).

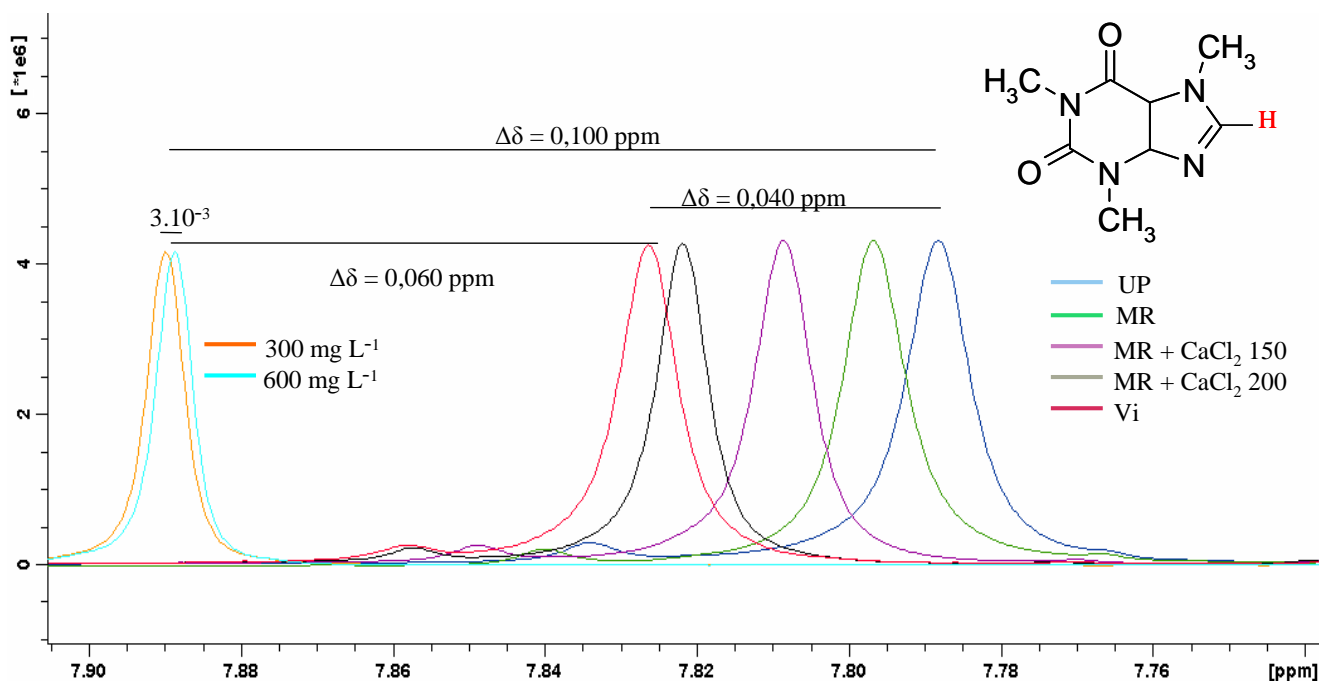
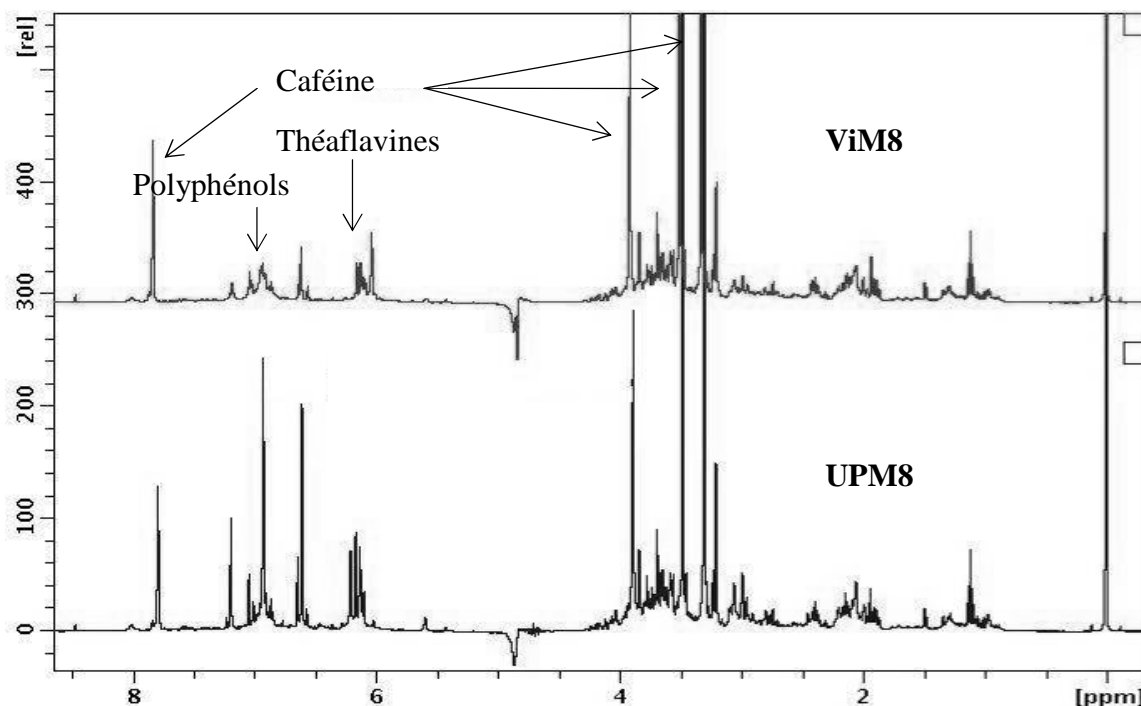


Figure 3.27 : Variation du déplacement chimique du proton H-8 dans les différentes liqueurs. Les intensités ont toutes été normalisées.

Tableau 3.26 : Variations des déplacements chimiques des protons de la caféine entre la caféine seule en solution et la caféine dans les liqueurs du thé M8 avec les eaux UP et Vi

Proton	$\Delta\delta$ (ppm)		
	caféine / ViM8	ViM8 / UPM8	caféine / UPM8
H-8	0,060	0,040	0,100
CH ₃ -1	0,028	0,020	0,048
CH ₃ -3	0,024	0,018	0,042
CH ₃ -7	0,040	0,022	0,062

Ces résultats montrent que le proton le plus affecté par la présence dans les liqueurs des autres composés est le proton H-8, proton le moins lié à la dimérisation de la caféine (incertitude la plus faible - Figure 3.26). Les polyphénols n'ont pu être pour le moment étudiés en détail. Cependant dans une étude encore préliminaire, nous avons pu observer de grandes différences au niveau de leurs signaux caractéristiques entre les liqueurs Vi et UP (Figure 3.28)(signaux identifiés par rapport aux données de la littérature (Le Gall *et al.*, 2004)), confirmant les analyses de polyphénols totaux. Ce point méritera donc d'être poursuivi afin de mieux comprendre le rôle de la composition de l'eau sur les interactions polyphénols-polyphénols, polyphénols-caféine et polyphénols ou caféine-cations tel que Ca voire Al.

**Figure 3.28 : Spectre RMN ¹H des liqueurs ViM8 et UPM8 par *excitation sculpting*.**

CHAPITRE 4

QUALITÉS ORGANOLEPTIQUES DES LIQUEURS DE THÉ

CHAPITRE 4. QUALITÉS ORGANOLEPTIQUES DES LIQUEURS DE THÉ	125
4.1. PROFIL SENSORIEL DE QUATRE THÉS	125
<i>4.1.1. Génération et sélection des descripteurs</i>	<i>125</i>
<i>4.1.2. Entraînement des juges</i>	<i>129</i>
4.1.2.1. Entraînement à l'aide de produits de référence	129
4.1.2.1.1. Acide et astringent.....	130
4.1.2.1.2. Solutions colorées.....	133
4.1.2.1.3. Goûts amer et d'astringence	133
4.1.2.1.4. Test de notation sur des solutions astringentes	133
4.1.2.2. Entraînement à l'aide de liqueurs de thé	135
<i>4.1.3. Analyse Descriptive Quantitative</i>	<i>136</i>
4.1.3.1. Pouvoir discriminant du panel	136
4.1.3.2. La justesse du panel	138
4.1.3.3. La répétabilité du panel	138
4.2. ÉVALUATION SENSORIELLE DES LIQUEURS D'UN THÉ NOIR	144

Chapitre 4. Qualités organoleptiques des liqueurs de thé

Dans le Chapitre 3, nous avons vu que la composition chimique de l'eau influence l'extraction des composés organiques et minéraux à partir des feuilles de thé. L'objectif a été ensuite d'étudier l'influence de la composition de l'eau sur les qualités organoleptiques des liqueurs de thé.

Dans un premier temps, quatre thés noirs provenant de jardins de la région indienne de Darjeeling, Ambootia, Am, Namring, M8, North Tukvar, Nt, et Nurbong, Nu, ainsi que deux eaux de composition chimique différente, Mont-Roucous (MR) et Thonon (T), ont été choisis pour cette étude. Dans un second temps, une analyse sensorielle des liqueurs du thé Namring préparées avec cinq eaux de composition différant par l'origine et la composition, MR, Vittel (Vi) et 3 eaux « synthétiques », a permis d'étudier plus spécifiquement l'influence de la teneur en calcium des eaux sur les propriétés organoleptiques des liqueurs. L'analyse sensorielle des liqueurs a été réalisée selon la méthode du Profil Sensoriel ou de l'« Analyse Descriptive Quantitative » (QDA) par 17 juges entraînés. Dans chacun des cas, elle s'est déroulée en trois étapes : le choix des descripteurs générés par le panel ou imposés, l'entraînement puis l'analyse.

4.1. Profil sensoriel de quatre thés

4.1.1. Génération et sélection des descripteurs

Les séances de génération des descripteurs ont eu lieu en cabine avec le thé M8 et les eaux MR et Vi pour la première et avec le thé M8 et les eaux MR, Vi, Evian[®] et Cristaline[®] pour la seconde. Les eaux choisies forment une gamme de minéralisation croissante. Lors de ces séances, chaque juge sent, regarde et goûte les liqueurs en notant les descripteurs évoqués par les produits. Les juges ont ainsi généré 37 descripteurs pour l'odeur, 51 pour l'apparence et 42 pour la flaveur. Chacun d'eux est ensuite recensé par juge et par produit. Il en découle une synthèse sous forme d'un tableau croisé dynamique qui permet de comptabiliser le nombre de juges citant un descripteur. Après élimination de ceux cités une seule fois, les 60 attributs restants sont présentés aux juges lors d'une réunion afin de les discuter et de regrouper les synonymes. À la suite de ce tri préliminaire, une liste de 19 descripteurs dont la définition a été obtenue par consensus du panel a été mise en place pour les quatre thés (Tableau 4.1).

Tableau 4.1 : Définition des descripteurs de l'analyse sensorielle du thé

Descripteurs		M ⁽¹⁾
Odeur	Définition	(%)
Herbe fraîche	Sent l'herbe fraîchement coupée	48,7
Foin	Arôme proche du foin rappelant la campagne	47,3
Douce	Odeur miellée (fleur d'acacia...), de caramel, de vanille	44,3
Terreuse	Odeur de terre humide, humus	34,1
Agrume	Rappelle des sensations (odeur et saveur) de type citron, pamplemousse	26,3
Boisée	Odeur de bois fraîchement coupé, copeaux de bois	20,7
Fruits rouges	Odeur de cassis, de framboise	15,8
Apparence	Définition	
Couleur jaune	Variation dans la couleur jaune de jaune à orange	69,8
Limpide	Propriété de laisser passer la lumière (de transparent à trouble)	63,0
Bulles	Présence de bulles d'air en surface collées aux parois de la tasse, en périphérie	61,5
Lumineux	Capacité du thé à renvoyer la lumière (de brillant à terne)	57,7
Terreuse	Odeur de terre humide, humus	34,1
Couleur verte	Présence de pigment vert	33,0
Dépôt huileux	Présence d'un film en surface rappelant l'aspect irisé d'une tâche d'essence	14,3
Flaveur	Définitions	
Amer	Saveur élémentaire provoquée par une solution aqueuse, <i>e.g.</i> la caféine	64,0
Astringent	Sensation de contraction de la surface des muqueuses, comme un assèchement de la bouche	53,8
Métallique	Rappelle la sensation que procure un ustensile en métal dans la bouche, boîte de conserve	50,2
Fade	Pauvre en flaveur, manque de caractère	38,3
Acide	Saveur élémentaire provoquée par une solution aqueuse, <i>e.g.</i> le citron	31,7
Piquant	Rappelle le piquant du poivre ou du piment	24,8

(5) : M : moyenne géométrique

La sélection des descripteurs retenus parmi les 19 cités précédemment a été faite à la suite d'une séance de notation. Cette notation a été réalisée sur quatre produits dont un doublon pour le thé M8. Le thé Nu a été infusé avec l'eau T, les thés Nt et M8 avec l'eau MR. Les juges devaient évaluer chaque descripteur en donnant une note allant de 0 à 5. La note 0 signifiait qu'ils ne percevaient pas la sensation correspondante au descripteur et la note 5 lorsqu'ils la percevaient très fortement. A la suite de cette séance, une réduction de termes a été effectuée par le calcul de la moyenne géométrique (M) (2.3.2.5.5). Si la moyenne géométrique est élevée, cela signifie que le descripteur a une fréquence de citations et une intensité élevées (Tableau 4.1).

D'après les moyennes géométriques, valeurs en gras dans le Tableau 4.1, les descripteurs les plus importants sont « couleur jaune », « amer », « limpide », « bulles » et « lumineux ».

Une seconde réduction de termes a été nécessaire « pour regrouper les descripteurs synonymes (corrélés positivement) ou antonymes (corrélés négativement) et pour éliminer les descripteurs qui ne contribuent que fort peu à mettre en évidence des différences entre les produits testés dans un profil sensoriel » selon la norme ISO 11035. Une Analyse en Composantes Principales, ACP, et une Analyse de variance, ANOVA, ont été réalisées à l'aide du logiciel XLstat®. Le récapitulatif des effets observés est présenté dans le Tableau 4.2 et la matrice de corrélation dans le Tableau 4.3.

Tableau 4.2 : Résultats du traitement statistique par ANOVA et ACP

Descripteurs		Effet juge	Effet produit	Descripteur corrélé au seuil de 5 %
Odeur	Agrume	0,004	0,448	n.c. ⁽¹⁾
	Boisée	< 0,0001	0,889	n.c.
	Douce	0,007	0,690	Amer (–) ⁽⁵⁾
	Foin	0,103 ⁽²⁾	0,733	n.c.
	Fruits rouges	0,100 ⁽²⁾	0,057⁽³⁾	Acide (+) ⁽⁶⁾
	Herbe fraîche	0,050	0,481	n.c.
	Terreuse	< 0,0001	0,733	n.c.
Apparence	Bulles	0,0450	0,087	Fade (–) et Lumineux (–) Dépôt huileux (+)
	Couleur jaune	0,109	< 0,0001 ⁽⁴⁾	Fade (–)
	Couleur verte	0,001	0,508	n.c.
	Dépôt huileux	0,002	0,117	Lumineux (–) et Bulles (+)
	Limpide	< 0,0001	0,005 ⁽⁴⁾	n.c.
	Lumineux	0,001	0,141	Bulles (–) et Dépôt huileux (–)
	Acide	< 0,0001	0,126	Fruits rouges (+)
Flaveur	Amer	0,002	0,087	Douce (–)
	Astringent	0,001	0,519	n.c.
	Fade	0	0,204	Bulles (–) et Couleur jaune (–)
	Métallique	0,021	0,059⁽³⁾	n.c.
	Piquant	0,012	0,843	n.c.
	(1) : n.c. : non corrélé		(4) :: effet significatif à 5 %	
(2) : effet non significatif		(5) : descripteur corrélé négativement		
(3) : effet significatif à la limite de 5 %		(6) : descripteur corrélé positivement		

Tableau 4.3 : Matrice de corrélation de l'ACP

	Couleur jaune	Couleur verte	Limpide	Lumineux	Bulles	Dépôt huileux	Herbe fraîche	Terreuse	Fruits rouges	Agrume	Acide	Amer	Métal- lique	Astrin- gent
Couleur jaune	1	0,418	-0,643	-0,299	0,772	0,175	-0,940	-0,933	0,892	-0,208	-0,224	-0,803	-0,418	0,536
Couleur verte	0,418	1	0,241	0,126	0,520	-0,319	-0,559	-0,449	0,327	0,480	-0,954	-0,094	-0,607	-0,292
Limpide	-0,643	0,241	1	0,823	-0,063	0,108	0,653	0,748	-0,368	0,090	-0,507	0,387	0,405	-0,338
Lumineux	-0,299	0,126	0,823	1	0,375	0,638	0,494	0,584	0,129	-0,454	-0,406	-0,174	0,700	0,253
Bulles	0,772	0,520	-0,063	0,375	1	0,570	-0,593	-0,523	0,946	-0,475	-0,517	-0,881	0,036	0,663
Dépôt huileux	0,175	-0,319	0,108	0,638	0,570	1	0,170	0,179	0,575	-0,972	0,164	-0,727	0,817	0,891
Herbe fraîche	-0,940	-0,559	0,653	0,494	-0,593	0,170	1	0,991	-0,700	-0,135	0,317	0,553	0,703	-0,221
Terreuse	-0,933	-0,449	0,748	0,584	-0,523	0,179	0,991	1	-0,670	-0,113	0,189	0,543	0,695	-0,242
Fruits rouges	0,892	0,327	-0,368	0,129	0,946	0,575	-0,700	-0,670	1	-0,556	-0,256	-0,969	-0,001	0,788
Agrume	-0,208	0,480	0,090	-0,454	-0,475	-0,972	-0,135	-0,113	-0,556	1	-0,369	0,735	-0,793	-0,936
Acide	-0,224	-0,954	-0,507	-0,406	-0,517	0,164	0,317	0,189	-0,256	-0,369	1	0,052	0,365	0,273
Amer	-0,803	-0,094	0,387	-0,174	-0,881	-0,727	0,553	0,543	-0,969	0,735	0,052	1	-0,203	-0,915
Métallique	-0,418	-0,607	0,405	0,700	0,036	0,817	0,703	0,695	-0,001	-0,793	0,365	-0,203	1	0,529
Astringent	0,536	-0,292	-0,338	0,253	0,663	0,891	-0,221	-0,242	0,788	-0,936	0,273	-0,915	0,529	1

En gras, valeurs significatives au seuil $\alpha = 0,05$

Les effets produits significatifs à 10 %, *i.e.* au moins un des produits est différent pour le descripteur, concernent les descripteurs « couleur jaune », « limpide », « métallique » et « fruits rouges ». Les effets juges non significatifs pour « foin » et « fruits rouges » montrent que les juges sont d'accord entre eux.

Les descripteurs présentant un effet produit significatif ont été gardés : « couleur jaune », « limpide », « métallique » et « fruits rouges » ainsi que les attributs qui possèdent une moyenne géométrique d'environ 50 % soit « amer », « bulles », « lumineux », « astringent » et « herbe fraîche ». Certains descripteurs comme « couleur verte » et « dépôt huileux » ont été conservés car ils décrivent l'apparence et devraient être facilement identifiables lors de l'évaluation. De plus, la formation du « dépôt huileux » est caractéristique d'une eau chargée en calcium et en carbonate (Chapitre 1). Les attributs « terreuse » et « acide » ont été conservés car ils ne présentent pas de corrélation et ils se trouvent dans la norme NF V 00-110. Le descripteur « agrume » a été gardé car le nombre de descripteurs d'odeur est faible. Finalement, 14 descripteurs ont été conservés pour établir le profil sensoriel (Tableau 4.4).

Tableau 4.4 : Descripteurs retenus pour l'analyse sensorielle des liqueurs de quatre thés noirs

Descripteurs retenus		
Odeur	Apparence	Flaveur
Agrume	Bulles	Acide
Fruits rouges	Couleur jaune	Amer
Herbe fraîche	Couleur verte	Astringente
Terreuse	Dépôt huileux	Métallique
	Limpide	
	Lumineux	

4.1.2. Entraînement des juges

L'entraînement des juges s'est fait en deux étapes : entraînement à l'aide de produits de référence puis entraînement sur des liqueurs de thé faisant partie du profil à réaliser.

4.1.2.1. Entraînement à l'aide de produits de référence

Pour chaque descripteur, un produit de référence a été proposé aux juges (Tableau 4.5).

Tableau 4.5 : Produits de référence proposés pour les différents descripteurs

Odeur	Références
Agrume	huile essentielle de <i>citrus sinensis</i> et jus de pamplemousse jaune Tropicana®
Fruits rouges	mercapto-3-méthylbutyl-3-formate, bourgeon de cassis ⁽¹⁾
Herbe fraîche	cis-3-hexenol ⁽²⁾
Terreuse	géosmine ⁽²⁾
Apparence	Références
Couleur jaune	Solutions à 0,5 et 1 % de colorant caramel E150 B dans l'eau MR
Flaveur	Références
Acide	acide citrique ⁽²⁾
Amer	caféine ⁽²⁾
Astringent	acide tannique ⁽²⁾ et sulfate d'aluminium ⁽²⁾

(1) : N° 14 dans le référentiel : Le nez du café (Lenoir, 1997)

(2) : Champ des odeurs® de Jean-Noël Jaubert

(3) : Norme V 09-003 (International Organisation for Standardisation, 1988)

Les images sensorielles pour « métallique », « bulles », « couleur verte », « dépôt huileux », « limpide » et « lumineux » étant bien comprises par l'ensemble du panel, aucun entraînement particulier n'a été mis en place pour ces descripteurs.

Pour la couleur jaune, toutefois, des références pour les extrémités de l'échelle ont été préparées en utilisant le colorant caramel E150 B. Plusieurs dilutions, allant de 2 % à 0,06 % ont été effectuées dans l'eau MR. Celles qui se rapprochaient le plus des liqueurs ont été choisies suivant leurs paramètres colorimétriques dans le repère (L^*, a^*, b^*) (Annexe 5). Il s'agit des solutions à 0,5 % et 1 % (Tableau 4.6).

Tableau 4.6 : Mesures au spectrophotomètre UV-visible CM-508i des solutions de référence et des liqueurs MRM8 et ViM8

	MRM8	ViM8	Concentration en caramel E150B	
			0,5 %	1 %
L	85,6	75,1	89,2	73,5
a	1,62	4,57	7,6	12,2
b	40,8	44,1	35,3	51,5

4.1.2.1.1. Acide et astringent

Ces perceptions ont été étudiées par deux essais analytiques de classement pour chacune des perceptions. Les références utilisées sont le sulfate d'aluminium, l'acide tannique, l'acide

citrique et l'acide tartrique. Les concentrations sont choisies au moyen de la norme NF V09-002 (Tableau 4.7) (International Organisation for Standardisation, 1975).

Tableau 4.7 : Concentrations (g L^{-1}) en sulfate d'aluminium, acide tannique, acide citrique et acide tartrique utilisées pour les tests de classement sur l'astringence et l'acidité

Échantillons	Référence pour l'astringence		Référence pour l'acidité	
	Sulfate d'aluminium (g L^{-1})	Acide tannique (g L^{-1})	Acide citrique (g L^{-1})	Acide tartrique (g L^{-1})
1	0	0	0	0
2	0,125	0,5	0,075	0,06
3	0,25	0,75	0,15	0,125
4	0,5	1	0,3	0,25
5	1	1,25	0,6	0,5
6	–	1,5	1,2	1
7	–	2	–	–

Pour chaque séance, les échantillons codés ont été présentés dans un ordre aléatoire. Cet ordre est commun à tous les juges pour s'assurer, lors de la comparaison des performances, que l'ordre de la présentation n'induit pas d'effet. Les panélistes doivent classer les solutions sur une feuille de réponse, le temps n'étant pas imposé.

Concernant les tests sur la perception de l'astringence, le sulfate d'aluminium a été utilisé dans un premier temps, car il est incolore et ne permet pas une distinction des différentes concentrations suivant l'intensité de la couleur contrairement à l'acide tannique. Cependant, pour des raisons sanitaires, il était préférable de ne plus utiliser l'aluminium. C'est pourquoi, lors du deuxième essai de classement, l'acide tannique a été employé et servi dans des gobelets bruns pour que les juges ne soient pas influencés par la couleur de la solution.

Les performances du panel lors des tests de classement ont été étudiées par le calcul du coefficient ρ de Spearman (2.3.2.5.5). Lors de la seconde séance, tous les juges ont retrouvé l'ordre théorique au seuil de 5 %, mis à part le juge 9 ; 7 juges (J2, J5, J6, J7, J10, J13, J17) sont au risque de 1 % (Tableau 4.8). Les performances des juges se sont améliorées entre les deux séances d'entraînement.

Tableau 4.8 : Performances individuelles lors du classement de solutions astringentes

N° séance	ρ_{Spearman} pour chaque juge																
	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17
1	0,50	0,90⁽¹⁾	0,70	0,50	1,00	0,70	0,90	0,60	0,40	1,00	0,90	0,60	-0,10	0,70	0,70	0,60	0,90
2	0,93	1,00	0,79	0,86	1,00	1,00	0,96	0,93	0,64	0,96	0,89	0,86	1,00	0,93	0,89	0,86	1,00

(1) : significatif au risque $\alpha = 5 \%$

L'acide tartrique et l'acide citrique ont été utilisés afin d'observer d'éventuelles différences de perception pour l'acidité. Sept juges sont significatifs à 5 % pour l'acide tartrique et trois sont hautement significatifs (risque $\alpha = 1 \%$) (Tableau 4.9). Les sept juges restants ont inversé l'ordre des trois premières solutions.

Tableau 4.9 : Performances individuelles lors du classement de solutions acides

Acide	ρ_{Spearman} pour chaque juge																
	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17
Tartrique	1,00⁽¹⁾	0,94⁽²⁾	0,83	0,83	1,00	0,94	0,77	0,77	0,83	0,77	0,94	0,83	0,94	0,94	0,94	1,00	0,94
Citrique	0,77	1,00	1,00	1,00	0,94	0,77	1,00	1,00	0,89	1,00	0,77	0,94	0,83	0,94	1,00	0,94	1,00

(1) Gras et italique : significatif au risque $\alpha = 1 \%$ (2) Gras seul : significatif au risque $\alpha = 5 \%$

En ce qui concerne l'acide citrique, 8 juges sont hautement significatifs à 1 % et 5 sont significatifs à 5 %. Seulement 4 juges ne retrouvent pas le classement théorique. Une meilleure performance pour l'acide citrique est observée. Cela peut s'expliquer par des concentrations légèrement plus élevées et un seuil de détection plus faible.

Le test de Friedman permet une approche globale des résultats ; pour la séance 1, le χ^2_{obs} calculé est hautement significatif ce qui indique que les solutions de sulfate d'aluminium différenciées (2.3.2.5.5). Le δ de Friedman calculé (Tableau 4.10) différencie les deux plus hautes concentrations et regroupe les trois premières. En ce qui concerne la deuxième séance, le χ^2_{obs} calculé est hautement significatif ce qui montre une différence perçue entre les échantillons d'acide tannique. Le δ de Friedman calculé sépare difficilement toutes les solutions, il regroupe deux fois trois solutions entre elles.

La discrimination des différentes intensités de saveur acide est globalement significative au vu du test de Friedman ($p < 0,001$).

Tableau 4.10 : Regroupement des solutions astringentes après le test de Friedman

Séance 1 : concentrations en sulfate d'aluminium (g L^{-1})	groupe		
	A	B	C
0	✓		
0,125	✓		
0,25	✓		
0,5		✓	
1,0			✓

Séance 2 : concentrations en acide tannique (g L^{-1})	groupe			
	A	B	C	D
0	✓			
0,5		✓		
0,75		✓		
1,0		✓		
1,25			✓	
1,5			✓	
2,0			✓	✓

4.1.2.1.2. Solutions colorées

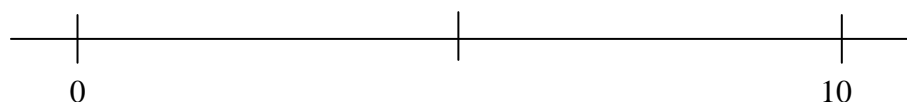
La gamme de solutions colorées est préparée à l'aide de liqueurs réalisées avec les eaux MR et Vi. Une masse de 4,5 g de feuilles de thé M8 est infusée à l'aide de 600 g d'eau. Au cours de l'infusion, un volume de 100 g de liqueur est prélevé toutes les 90 s pendant 7,5 min. La gamme est formée en choisissant 5 échantillons parmi les 10 échantillons ainsi obtenus et elle s'étend de jaune clair à l'orange brun. Les 5 échantillons retenus sont les liqueurs avec l'eau MR après 1,5 min et 6 min ; la liqueur Vi à 3 min, la liqueur MR à 7,5 min et la liqueur Vi à 7,5 min. L'ensemble des juges a retrouvé l'ordre théorique des solutions au risque α de 10 % dont 11 au risque de 1 %. Le panel n'a pas rencontré de problème majeur pour discriminer les couleurs des différentes liqueurs de thé.

4.1.2.1.3. Goûts amer et d'astringence

Les juges confondent généralement les goûts amer et d'astringence. Afin de palier ce problème, un apprentissage sur des références chimiques et alimentaires a été effectué. Chaque juge a ainsi goûté en premier une solution de caféine à $0,54 \text{ g L}^{-1}$, référence pour l'amertume (Civille & Lyon, 1996). Il a dégusté ensuite deux produits alimentaires amers (Schweppes® et chocolat Lindt® 99 % de cacao). Puis, les juges ont goûté la solution d'acide tannique à 1 g L^{-1} , référence pour l'astringence et, comme pour l'amertume, ils ont dégusté deux produits alimentaires caractéristiques de la saveur d'astringence (Jus de Cranberry et banane verte).

4.1.2.1.4. Test de notation sur des solutions astringentes

Après les différents essais analytiques de classement, les juges doivent être entraînés à quantifier ces sensations sur des échelles continues avec une borne centrale (Figure 4.1). La saveur astringente, caractéristique du thé, a été utilisée lors de cet entraînement.

**Figure 4.1 : Échelle de notation**

Dans un premier temps, les juges ont dégusté une solution de référence représentant le centre de l'échelle. Par la suite, ils ont dû noter 5 solutions parmi lesquelles la solution de référence ainsi qu'une des quatre solutions présentée en double. En considérant la moyenne des notes ainsi que les notes maximales et minimales obtenues lors de la première séance (Tableau 4.11), nous observons une inversion entre les solutions contenant 1,5 et 1,25 g L⁻¹.

Tableau 4.11 : Récapitulatif des moyennes, des notes maximales et minimales pour chaque concentration pour les deux séances

Concentrations (g L ⁻¹)	Séance 1			Séance 2		
	Moyenne	Minimum	Maximum	Moyenne	Minimum	Maximum
0,5	–	–	–	4,0	0,4	5,7
0,5	–	–	–	4,2	1,0	7,5
0,75 ⁽¹⁾	4,2	0,9	10	5,5	0,7	9,2
1,0 ⁽²⁾	5,0	1,8	9,8	8,4	5,7	10
1,25	8,0	5,0	9,8	8,4	1,8	10
1,25	6,7	1,6	8,8	–	–	–
1,5	7,8	2,3	10	–	–	–

(1) : solution de référence pour la séance 2

(2) : solution de référence pour la séance 1

Lors de la seconde séance, l'ordre des concentrations a été bien respecté. L'écart des moyennes entre les duplicats a ensuite été évalué au moyen d'un test de Student, où H_0 représente l'hypothèse « les moyennes sont égales » et H_1 l'hypothèse « les moyennes sont différentes ». Le test de Student permet de conclure à l'hypothèse H_0 pour les deux séances, toutefois le risque d'accepter H_1 à tort est beaucoup plus élevé lors de la seconde séance, ce qui signifie que l'écart entre les moyennes des répétitions est beaucoup moins important. Ce résultat montre que les juges ont amélioré leur répétabilité lors de la deuxième séance et que la note attribuée à la solution de référence est en moyenne 5 pour la première séance et 5,5 pour la deuxième. Dans l'ensemble, le panel s'est amélioré. Il retrouve l'ordre des solutions, il est répétable et juste. Cependant, quand nous observons les notes minimales et maximales pour chacune des concentrations, il apparaît alors que certains juges ne sont pas très fiables.

4.1.2.2. Entraînement à l'aide de liqueurs de thé

L'entraînement du panel à l'aide de liqueurs de thé n'a eu lieu qu'en une seule séance avec deux produits : les thés Am et M8 infusés avec de l'eau Cristaline® et un duplicat pour le thé M8. L'eau Cristaline a été utilisée car elle présente une concentration en calcium intermédiaire ($\sim 40 \text{ mg L}^{-1}$) entre l'eau T et l'eau MR. Les juges devaient évaluer chaque descripteur sur une échelle continue de 10 cm dont les extrémités étaient « peu » et « beaucoup » sauf pour la couleur jaune dont l'échelle était bornée par les termes « jaune » et « orange » (Figure 4.2). Les définitions de chaque terme étaient à la disposition du juge, ainsi que les références s'il en exprimait le souhait.



Figure 4.2 : Échelle de notation continue de 10 cm

Les performances des juges ont été étudiées par une ANOVA à deux facteurs (juges et produits) avec interactions (Tableau 4.12).

Tableau 4.12 : Étude de la performance du panel par une ANOVA à deux facteurs avec interactions lors de l'entraînement

	Probabilité du modèle	Effet juge	Effet produit	Effet répétition	Effet interaction
Couleur jaune	< 0,0001	0,005	< 0,0001 ⁽¹⁾	0,790	0,005
Couleur verte	<i>0,062</i> ⁽¹⁾	0,007	0,374	0,285	0,687
Limpide	0,001	0,000	0,114	0,643	0,017
Lumineux	0,001	0,000	0,735	0,567	0,031
Bulles	0,028	0,001	0,250	0,416	0,914
Dépôt huileux	< 0,0001	< 0,0001	0,902	0,394	0,988
Herbe fraîche	0,027	0,002	0,646	0,881	0,492
Terreuse	<i>0,158</i>	0,029	0,442	0,797	0,673
Fruit rouge	0,001	< 0,0001	0,028	0,218	0,619
Agrume	0,000	< 0,0001	0,784	0,221	0,987
Acide	0,000	< 0,0001	0,928	0,851	0,483
Amer	0,023	0,014	0,009	0,032	0,448
Métallique	0,026	0,002	0,669	0,378	0,546
Astringent	0,023	0,005	0,226	0,069	0,395

(1) En italique : Effet non significatif au risque $\alpha = 5 \%$

(2) En gras : Effet significatif au risque $\alpha = 5 \%$

Deux descripteurs seulement, « couleur jaune » et « fruits rouges », ont permis de discriminer les produits entre eux car ils ont un effet produit significatif à 5 % (Tableau 4.12). Cependant pour le descripteur « couleur jaune », il existe un effet interaction significatif ce qui signifie que les juges n'ont pas été d'accord entre eux sur ce descripteur. Il en est de même pour les termes « limpide » et « lumineux ». L'effet répétition n'a été significatif que pour un seul descripteur « amer ». Les descripteurs « couleur verte » et « terreuse » présentaient une probabilité du modèle non significative ce qui veut dire que la variance totale n'explique pas les variables. En résumé, les résultats de cette séance d'entraînement ont montré que globalement le panel était consensuel et répétable. Le faible nombre de produits évalués lors de cet entraînement ne permet pas de juger son pouvoir discriminant.

4.1.3. Analyse Descriptive Quantitative

L'analyse sensorielle a été réalisée sur 16 liqueurs de thés avec 17 juges et 14 descripteurs. Elle s'est déroulée en 4 séances d'évaluation regroupées sur une même semaine. Lors de chaque séance, 4 produits codés ont été présentés aux juges de façon monadique et dans un ordre aléatoire. La présentation des produits a suivi un plan d'expérience équilibré complet : chaque produit est dégusté au total autant de fois par chaque juge et tous les juges dégustent tous les produits. Le logiciel Tastel[®] a été utilisé pour générer les codes et l'ordre aléatoire des échantillons. L'évaluation des descripteurs se fait sur une échelle non structurée allant de « peu » à « beaucoup » définie lors de l'entraînement. La performance du panel a été évaluée en terme d'efficacité (pouvoir discriminant), de justesse et de répétabilité par une Analyse de Variance (ANOVA) à deux facteurs, « produits * juges », avec interaction.

4.1.3.1. Pouvoir discriminant du panel

Les résultats de l'effet produit montrent que cinq descripteurs « dépôt huileux », « terreuse », « fruit rouge », « acide » et « agrume » ne permettent pas de discriminer les liqueurs de thés, c'est-à-dire qu'au moins un juge a noté deux produits différents de manière identique pour ces descripteurs (Tableau 4.13).

Tableau 4.13 : Étude des performances du panel par ANOVA

Descripteurs	Effet Produit	Effet interaction Produits * juges	Effet répétition
Couleur jaune	< 0,0001	< 0,0001	0,974
Couleur verte	< 0,0001	< 0,0001	0,180
Limpide	< 0,0001	0,277	0,003
Lumineux	< 0,0001	0,0003	0,001
Bulles	< 0,0001	0,779	0,867
Dépôt huileux	0,091⁽¹⁾	0,903	0,521
Herbe fraîche	0,005	0,006	0,655
Terreuse	0,071	0,035	0,382
Fruit rouge	0,606	0,525	0,518
Acide	0,515	0,113	0,731
Agrume	0,692	0,130	0,296
Amer	< 0,0001	0,459	0,006
Métallique	0,000	0,001	0,182
Astringent	< 0,0001	0,650	0,359

(1) : Effet significatif au risque $\alpha = 5\%$

Le test de Newman Keuls confirme ces résultats car pour les cinq descripteurs cités, tous les produits sont considérés comme appartenant à un même groupe A (2.3.2.5.5)(Tableau 4.14).

Tableau 4.14 : Résultats du test de comparaison multiple Newman Keuls

Descripteurs	MRAm	MRNt	MRM8	MNu	TAm	TNt	TM8	TNu
Couleur jaune	5,0C	1,2E	7,4B	5,5C	7,5B	2,2D	8,7A	7,5B
Couleur verte	1,3D	3,1B	1,4D	1,3D	2,8BC	4,3A	2,2C	2,7BC
Limpide	7,3A	7,8A	6,8A	7,3A	5,6B	5,5B	5,3B	5,4B
Lumineux	7,1A	7,4A	6,8A	7,1A	5,2B	5,2B	4,6B	5,1B
Bulles	1,3C	3,8AB	1,5C	2,6BC	4,4A	3,8AB	4,3A	4,9A
Dépôt huileux	1,1A	0,9A	1,3A	1,2A	1,3A	1,0A	1,7A	1,4A
Herbe fraîche	4,4AB	5,5B	4,8AB	4,3AB	5,3AB	4,1B	4,4AB	4,0A
Terreuse	2,5A	2,1A	2,7A	2,6A	2,9A	2,4A	3,4A	3,2A
Fruit rouge	1,8A	1,7A	2,1A	1,9A	2,2A	1,7A	2,3A	2,2A
Acide	1,7A	1,6A	1,8A	1,8A	1,9A	1,6A	2,1A	1,9A
Agrume	1,8A	1,5A	1,9A	1,8A	1,9A	1,6A	2,2A	1,9A
Amer	7,1A	4,3CD	5,5BC	6,8AB	6,2AB	3,2D	4,4CD	6,2AB
Métallique	5,0A	4,0ABC	4,0ABC	4,6AB	5,1A	3,0C	3,7BC	4,3ABC
Astringent	4,3AB	3,4BC	3,6BC	5,0A	4,1AB	2,4C	3,2BC	4,5AB

De plus, les moyennes des notes sont faibles et au moins un juge a mis zéro à tous les produits pour ces attributs. Ces sensations n'ont donc pas été perçues par certains juges et les produits n'étaient pas assez différents pour pouvoir être discriminés par le panel sur la base de ces

descripteurs. Pour les autres attributs, le panel est très discriminant puisque l'effet produit est inférieur à 0,005 et les résultats du test de comparaison multiple Newman Keuls confirment bien la discrimination significative des liqueurs de thé.

4.1.3.2. La justesse du panel

L'effet interaction « juge * produits » a été significatif pour cinq descripteurs « couleur jaune », « couleur verte », « lumineux », « terreuse » et « métallique », le panel n'a donc pas été d'accord sur l'évaluation des produits à partir de ces descripteurs. Ces différences d'évaluation peuvent être dues soit à un problème de sensibilité des juges, soit à une utilisation différente de l'échelle, soit à des classements différents des produits. Les classements donnés par le panel et par chaque juge pour les descripteurs présentant un effet interaction significatif ont été comparés en calculant le coefficient de Spearman, par juge et par descripteur. Dans le cas de « couleur jaune », les coefficients de Spearman variaient entre 0,59 et 0,99, ces valeurs élevées ont montré que les juges classaient les produits de la même manière. Le manque de consensus observé avec l'effet d'interaction provient d'une utilisation différente de l'échelle, l'étendue des notes étant différente selon les juges. Le même phénomène a été observé pour « couleur verte ». Dans le cas des trois descripteurs restants, les coefficients de Spearman sont parfois très faibles, voire négatifs pour certains juges. Cela peut être dû à un problème de compréhension des attributs ou bien à un manque de sensibilité des juges qui noteraient alors au hasard. Cette dernière hypothèse est confirmée par les effets produits, obtenus en effectuant une ANOVA à un facteur (produit). Cependant, une analyse de variance sur la moyenne des répétitions a été effectuée et la variance des produits a été comparée à la variance totale qui comprend l'interaction « juges * produits ». La différence entre les produits est plus grande que la différence d'accord entre les juges. En conséquence, l'effet interaction de la première ANOVA a donc pu être relativisé. Les juges ont été relativement d'accord entre eux pour les descripteurs « lumineux », « métallique », « herbe fraîche » et « terreuse ».

4.1.3.3. La répétabilité du panel

Les résultats de l'ANOVA à deux facteurs « juges * produits » avec interaction montrent un effet répétition pour les trois descripteurs suivants : « limpide », « lumineux » et « amer » (Tableau 4.13). Une ANOVA à un facteur (produit) avec interaction a été réalisée pour observer l'effet répétition de ces trois descripteurs pour chaque juge. Un seul juge (juge 1) n'a pas été répétable pour « limpide » et « lumineux » et deux juges seulement (juges 8 et 16) ne

l'ont pas été pour « amer ». Compte tenu de l'effet produit important, nous pouvons considérer que le panel a été globalement répétable.

En résumé, l'évaluation de la performance du panel a montré que ce dernier était discriminant sur certains descripteurs, qu'il présentait un consensus et qu'il était répétable lors de l'analyse. La cartographie des liqueurs des thés peut être réalisée en conservant les descripteurs discriminants et consensuels : « amer », « bulles », « limpide » et « astringent ». Les descripteurs « couleur jaune » et « couleur verte » sont fortement discriminants et le manque de consensus est dû uniquement à l'utilisation différente de l'échelle. Les descripteurs « lumineux », « herbe fraîche » et « métallique » sont discriminants et leur manque de consensus est faible par rapport à la différence entre les produits. En conclusion, neuf descripteurs ont été utilisés par la suite pour reconnaître le profil sensoriel des liqueurs des thés. Un profil en représentation radar (Figure 4.3) a été réalisé à partir de la moyenne des réponses des juges des neuf descripteurs cités ci-dessus pour chaque produit (Tableau 4.15).

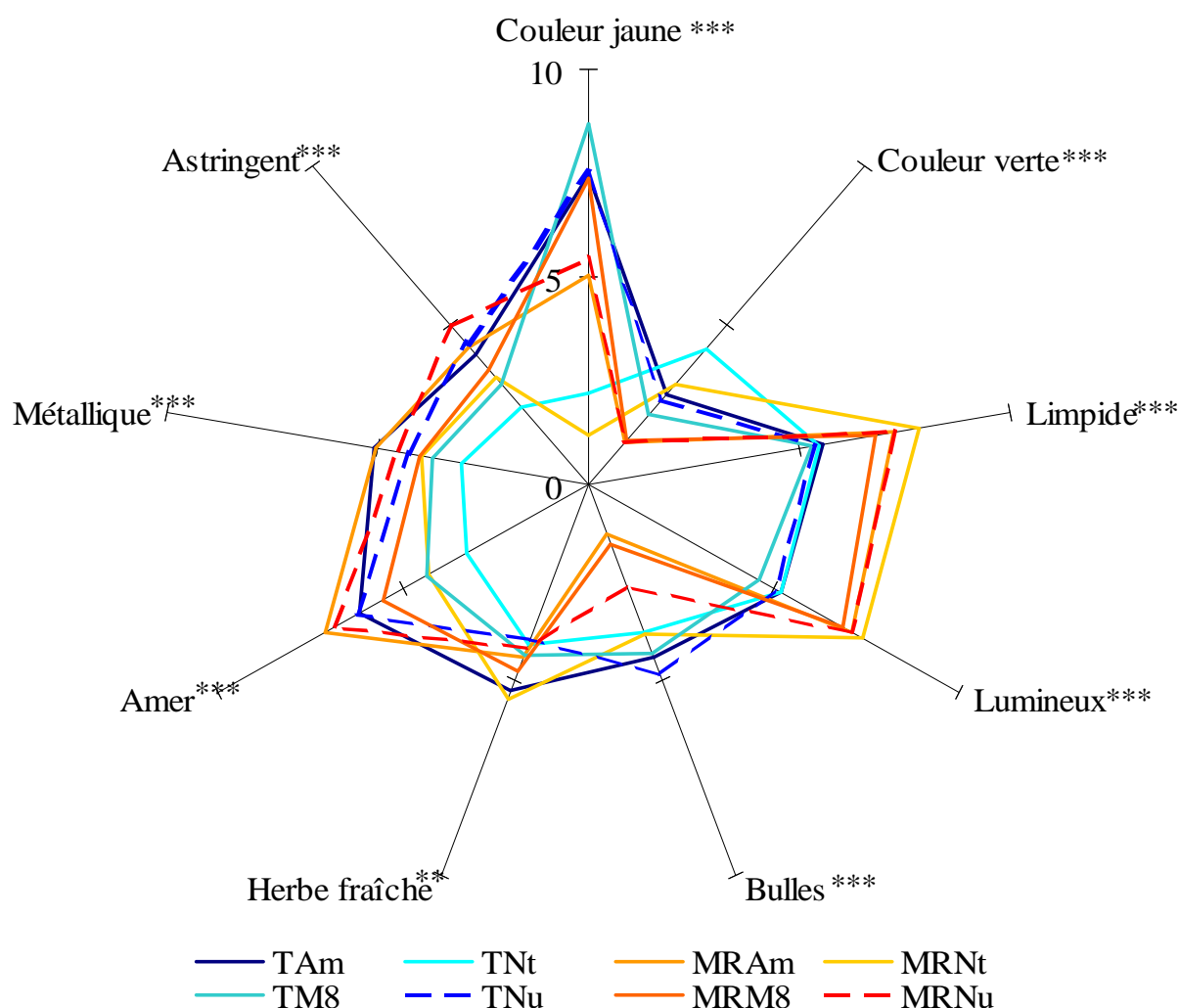


Tableau 4.15 : Moyenne des réponses obtenues pour chaque descripteur et chaque échantillon par l'ensemble des juges

Ech. ⁽¹⁾	Couleur jaune	Couleur verte	Limpe	Lumineux	Bulles	Dépôt huileux	Herbe fraîche	Terreuse	Fruits rouges	Agrume	Acide	Amer	Métal- lique	Astring- ent
MRAm1	5	1,6	7	6,9	0,6	1,1	4,7	3,8	2	1,2	1,9	7,5	5,2	4,7
MRAm2	5,1	1	7,5	7,2	1,9	1	4,1	2,6	1,6	1,9	1,9	6,7	4,9	4
MRNt1	1,2	3,2	7,4	7,3	3,9	0,9	5,3	3	1,8	1,9	2,2	4,5	3,8	3,2
MRNt2	1,2	3	8,3	7,5	3,7	0,9	5,7	2,2	1,7	2	1,5	4,1	4	3,6
MRM81	7,6	1,2	6,3	6,6	1,3	1,8	4,6	2,6	2	2,4	1,5	6,1	4,1	3,8
MRM82	7,1	1,5	7,3	7,1	1,8	1,7	5	2,3	2,4	1,5	1,9	5	3,9	3,4
MRNu1	5,4	1,3	7,9	7,4	2,7	1	4,5	2,9	1,8	2,6	2,1	6,7	5,1	5,1
MRNu2	5,5	1,4	6,7	6,8	2,6	1,3	3,9	2,9	2	1,7	1,8	7	4,1	4,7
TAm1	7,2	3	4,6	3,8	4,9	1,7	5,3	3,6	1,7	1,6	1,7	6,6	5,3	3,9
TAm2	7,7	2,7	6,6	6,5	3,9	1,2	5,3	3,2	1,7	1,4	1,6	5,7	4,9	4,3
TNt1	2,2	4,5	5,3	4,9	4,1	1,4	4,2	2,2	2,4	1,7	2	3,3	3,6	2,6
TNt2	2,3	4,1	5,6	5,4	3,4	1,3	4	1,9	1,9	2,2	1,7	3,2	2,3	2,2
TM81	8,8	2,4	4,7	4,2	4,1	1,5	4,7	2	2,5	2,1	1,7	5	3,5	3,5
TM82	8,6	2	5,8	4,9	4,5	0,9	4	2,8	2,2	1,6	1,5	3,8	3,9	2,9
TNu1	7,5	2,8	4,8	4,8	5,3	1,1	3,8	2,4	2,3	1,4	2	7,2	4,3	4,6
TNu2	7,5	2,6	6	5,3	4,5	1,5	4,2	3,1	1,8	2,2	2,2	5,2	4,2	4,3

(1) : chiffres correspondant aux doublons effectués pour chaque échantillon

La représentation radar des résultats montre que les liqueurs du thé Nt apparaissent différentes des autres et que celles réalisées avec la Thonon[®] ont une couleur plus orangée que jaune et sont moins limpides et lumineuses que celles obtenues avec la Mont-Roucous[®].

Une analyse en composantes principales (ACP) a permis de représenter de manière plus explicite les échantillons et les variables et de mettre en évidence les différences de profils entre les échantillons. Pour cette analyse, seuls les descripteurs discriminants ont été pris en compte (Figures 4.4, 4.5 et 4.6). Le cumul de la variance expliquée par les axes F1, F2, F3 et F4 est de 93 % avec 43 % pour F1, 28 % pour F2, 13 % pour F3 et 8 % pour F4.

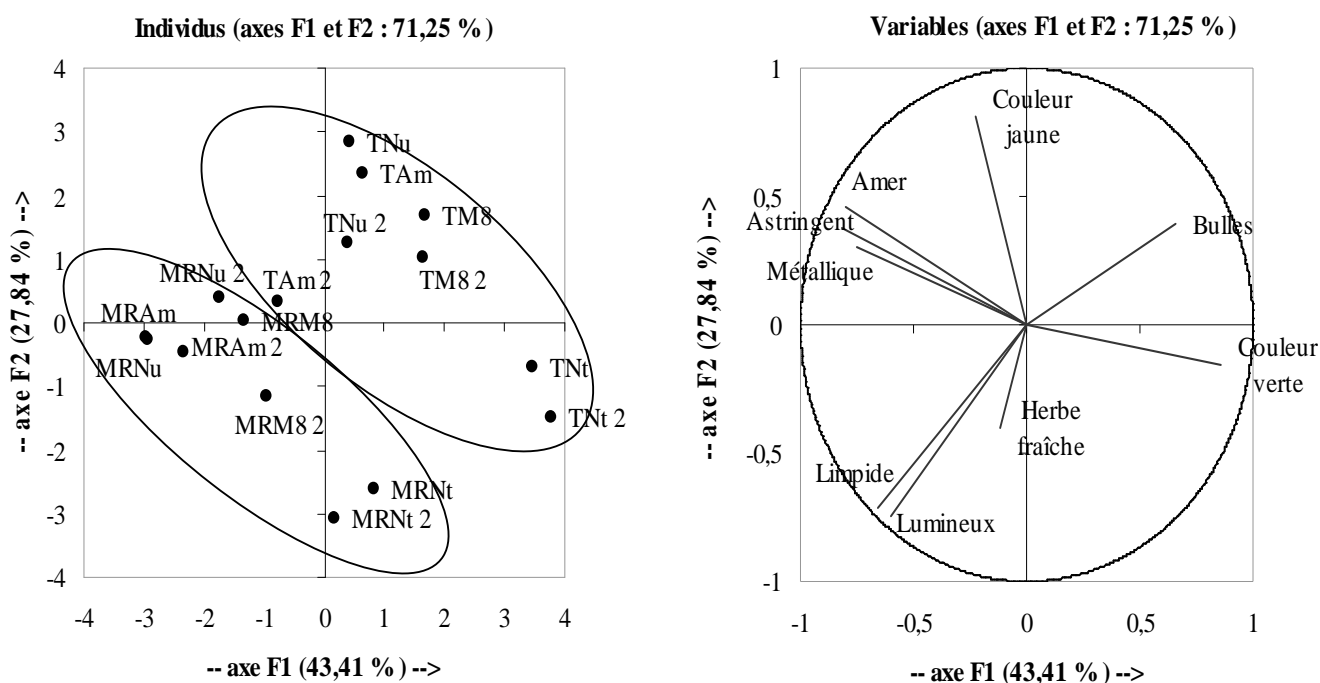


Figure 4.4 : ACP normée sur les neuf descripteurs et les huit liqueurs sur les F1 et F2

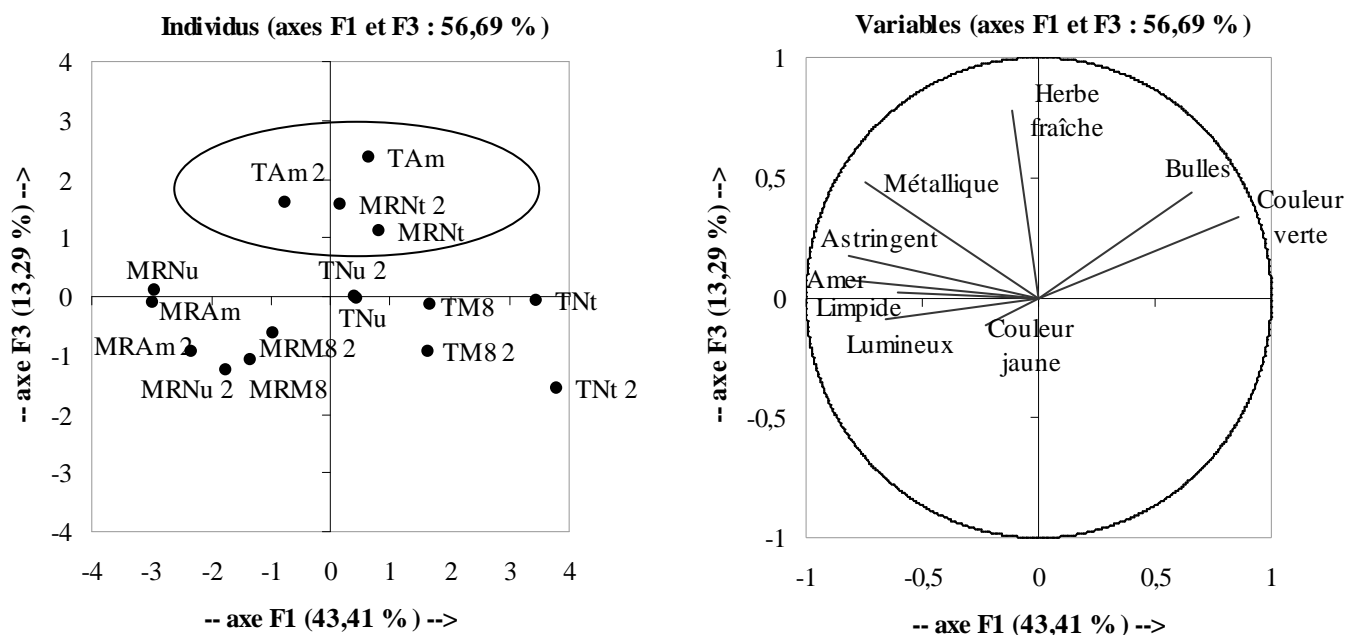


Figure 4.5 : ACP normée sur les neuf descripteurs et les huit liqueurs sur les axes F1 et F3

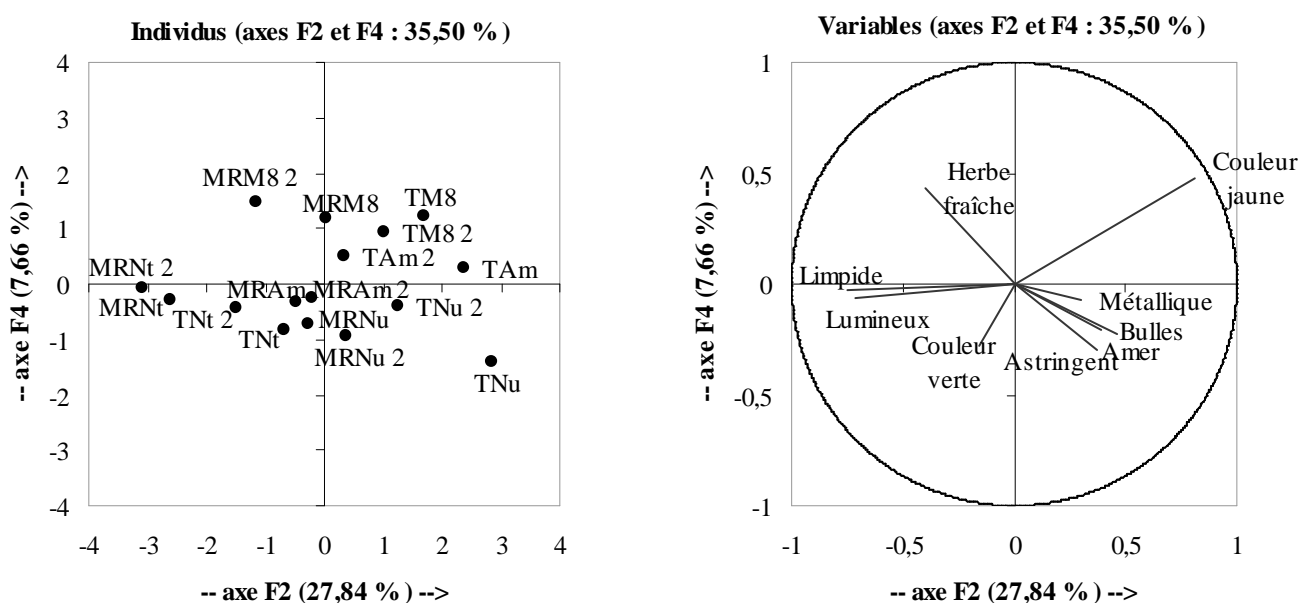


Figure 4.6 : ACP normée sur les neuf descripteurs et les huit liqueurs sur les axes F2 et F4

Les descripteurs « amer », « astringent » et « métallique » sont positivement corrélés ainsi que « lumineux » et « limpide ». Par contre, « couleur verte » et « amer » sont négativement corrélés ainsi que « lumineux » et « bulles ». L'axe F1 représente « couleur verte », « amer », « astringent » et « métallique » et l'axe F2 « limpide » et « lumineux ». Les descripteurs « bulles » et « herbe fraîche » contribuent à l'axe F3. La « couleur jaune » est très bien représentée par les axes F2 et F4.

Dans la suite de ce paragraphe, les descripteurs « amer », « astringent » et « métallique » sont appelés les descripteurs de flaveur et les descripteurs « lumineux » et « limpide », les descripteurs de clarté.

Le graphique et le cercle de corrélation dans le plan 1-2 montrent que les produits MRAm, MRAm 2 et MRNu sont caractérisés par une flaveur très forte, une couleur jaune et une clarté intermédiaire (Figure 4.4). Par opposition, les produits TNt et TNt 2 présentent une couleur verte très prononcée avec quelques bulles et une flaveur très faible, une couleur jaune, une odeur d'herbe fraîche et une clarté faible. Les produits MRNt et MRNt 2 sont définis comme ayant une clarté très prononcée ; ils sont brillants et transparents, ils ont une couleur verte intermédiaire, une flaveur faible, une couleur très jaune et une absence de bulles. Ils dégagent aussi une forte odeur d'herbe fraîche. Enfin, le produit TNu présente une couleur beaucoup plus orange que jaune, il a une flaveur intermédiaire, une clarté nulle, il est trouble et terne. Il est caractérisé par quelques bulles, très peu de couleur verte et d'odeur d'herbe fraîche.

Le graphique et le cercle de corrélation dans le plan 1-3 et le plan 1-2, indiquent que les produits TAm et TAm 2 sont définis par une forte odeur d'herbe fraîche, une couleur plus orange que jaune, ainsi que par une présence de bulles plus importante que pour les autres thés et une faible couleur verte (Figures 4.4 et 4.5). Ils ont un goût métallique plus prononcé par rapport aux autres descripteurs de la flaveur et une clarté faible. Enfin, la Figure 4.6 montre que les produits MRM8, MRM8 2, TM8 et TM8 2 sont assez proches. Ils présentent tous une forte couleur orange par rapport aux autres thés. Cependant les liqueurs réalisées avec l'eau T sont plus orange que celles réalisées avec l'eau MR. Les thés MRM8 1 et 2 possèdent une forte odeur d'herbe fraîche et une astringence très peu marquée par rapport aux autres descripteurs de la flaveur ainsi qu'une couleur verte inexistante. Ils sont d'une clarté intermédiaire et plus importante que les thés TM8 et TM8 2 qui sont plus ternes et troubles. La présence de bulles est faible pour les thés MRM8 et elle est intermédiaire pour les thés TM8.

En conclusion de ce profil, les thés Am et Nu semblent assez proches au niveau de l'apparence et de la flaveur. Le thé Nt présente une couleur très jaune par rapport aux autres thés. Il est aussi beaucoup plus clair et très riche en odeur d'herbe fraîche. Par contre sa flaveur est très pauvre, il semble que ce soit un thé plutôt fade. Le thé M8 présente une couleur plus orange que les thés Am et Nu, de même il serait moins clair que les autres, avec une forte odeur d'herbe fraîche et une flaveur intermédiaire.

La Figure 4.4 met en avant l'influence de l'eau utilisée sur la limpidité des liqueurs quel que soit le thé utilisé. Ainsi, les liqueurs réalisées avec l'eau T apparaissent moins limpides et lumineuses que celles réalisées avec l'eau MR. De plus, ces dernières sont également plus jaunes que orange. L'odeur d'herbe fraîche ne semble pas dépendre de l'eau utilisée mais plus de la composition initiale des thés. En effet, elle augmente pour le thé Am et diminue pour les thés Nu et Nt lorsqu'ils sont infusés avec l'eau T. Par contre, la flaveur semble diminuer quand le thé est infusé avec l'eau T, cependant cela semble aussi dépendre des thés puisque nous observons une légère augmentation du goût amer et métallique pour le thé M8. L'eau utilisée pour infuser le thé semble donc avoir une influence sur les descripteurs d'apparence et de flaveur.

4.2. Évaluation sensorielle des liqueurs d'un thé noir

Par la suite, nous avons choisi de nous concentrer sur un seul thé, le thé M8 afin d'étudier si la teneur en calcium est le seul facteur influençant l'apparence des liqueurs ou si la nature du contre-ion peut également jouer un rôle. Pour cela, 5 liqueurs préparées à l'aide des eaux synthétiques étudiées dans le Chapitre 3 et des eaux Vi et MR ont été évaluées par les 17 juges du panel utilisé pour le profil sensoriel précédent. Pour cette évaluation, les 6 descripteurs suivants ont été préalablement sélectionnés d'après les données bibliographiques et imposés aux juges : « couleur jaune », « astringent », « acide », « amer », « odeur globale » et « flaveur globale ». Les produits ont été présentés de façon monadique dans un ordre aléatoire. La moyenne des notes attribuées par l'ensemble des juges pour chaque produit est reportée dans le Tableau 4.16 et représentée sur la Figure 4.7.

Tableau 4.16 : Moyenne des notes obtenues pour chaque descripteur et chaque produit pour l'ensemble du panel

Produits	Couleur jaune	Odeur globale	Flaveur globale	Astringent	Acide	Amer
MR 1	6,6	5,4	5,5	5,7	1,9	5,9
MR 2	5,7	5,0	5,8	4,8	2,4	7,5
Vi 1	7,9	5,3	5,2	3,5	2,0	4,7
Vi 2	7,7	5,2	4,3	3,6	2,1	4,5
CaCl ₂ B 1	4,7	3,9	3,8	3,7	1,7	4,0
CaCl ₂ B 2	4,1	4,8	4,1	3,7	1,8	4,7
CaSO ₄ 1	4,5	4,4	4,4	4,1	1,9	4,6
CaSO ₄ 2	3,6	4,4	4,9	4,2	2,2	4,0
CaCO ₃ 1	7,5	5,5	5,2	5,0	2,7	5,9
CaCO ₃ 2	7,5	4,9	4,9	5,0	2,5	5,2

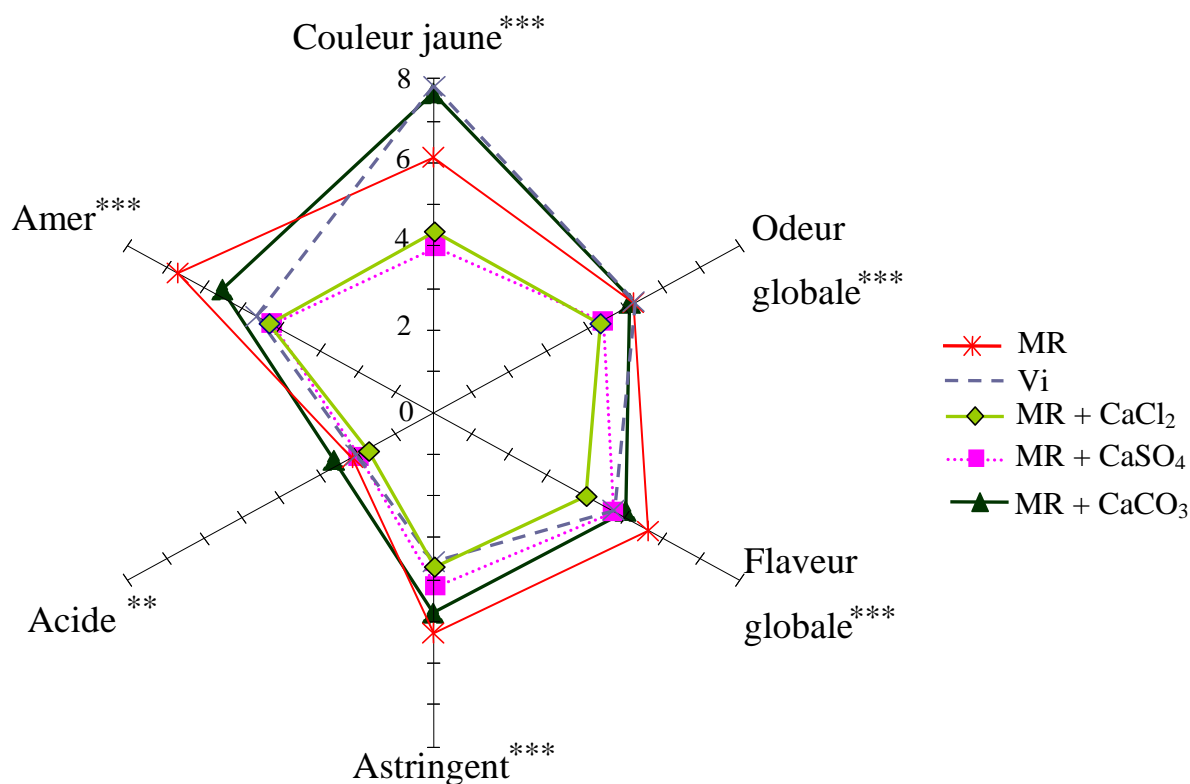


Figure 4.7 : Profils sensoriels de 5 liqueurs du thé M8. Descripteurs significativement discriminants :
 *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$

La représentation radar montre que la couleur des liqueurs est le descripteur qui varie le plus en fonction de l'eau utilisée (Figure 4.8). Au contraire, le caractère acide ne présente pas de réelle différence.

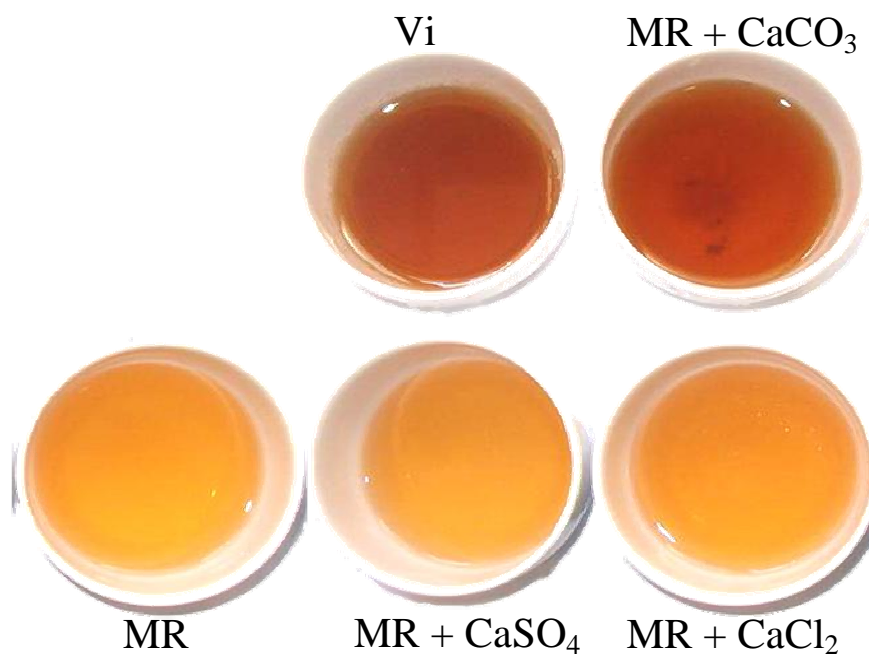


Figure 4.8 : Les cinq liqueurs de thé M8 présentées dans le bol de dégustation

Comme précédemment, la performance du panel a été évaluée par une ANOVA à deux facteurs avec interactions « juges * produits » (Tableau 4.17).

Tableau 4.17 : Étude de la performance du panel lors de l'analyse des cinq liqueurs de thé M8

	Couleur jaune	Flaveur globale	Odeur globale	Astringent	Acide	Amer
Probabilité du modèle	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Juges	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Produit	< 0,0001	0,006	0,030	0,001	0,613	< 0,0001
Répétition	0,015	0,497	0,510	0,660	0,841	0,185
« juges * produits »	0,679	0,040	0,009	0,014	0,522	0,045

La probabilité associée au modèle est très faible pour tous les descripteurs ($p < 0,0001$), cela signifie que ce modèle est valide dans chaque cas et que la variance totale peut alors être expliquée. L'effet juge est significatif à 5 % pour tous les descripteurs ce qui signifie que les juges n'utilisent pas l'échelle de la même manière. L'effet produit n'est pas significatif à 5 % pour le descripteur « acide », il ne permet pas de discriminer les 5 liqueurs. L'interaction « juge * produit » est significative à 5 % pour 4 descripteurs, *i.e.* au moins un juge a noté au moins un produit différemment sur la base de ces descripteurs.

L'effet répétition est significatif à 5 % et non significatif à 1 % pour le descripteur « couleur jaune ». L'ANOVA à un facteur (produit) avec interaction montre que seul un juge n'est pas répétable.

En résumé, le résultat des performances du panel permet d'exploiter les données sensorielles obtenues. Les cinq descripteurs suivants seront utilisés pour exprimer le profil sensoriel des liqueurs des thés : « couleur jaune », « odeur globale », « flaveur globale », « astringent » et « amer ».

Cette analyse a été complétée par un test de Newman Keuls (Tableau 4.18) permettant de regrouper les produits perçus comme similaires.

Tableau 4.18 : Regroupement des produits pour chaque descripteur après le test de Newman Keuls

	Couleur jaune	Odeur globale	Flaveur globale	Astringent	Acide	Amer
A	P4 P3	P1->P5	P2->P5	P3 P5	P1->P5	P5
B	P5		P1 P2 P4	P1->P3		P3
C	P1 P2			P1 P2 P4		P1 P2 P4

P1 : MR + CaCl₂ ; P2 : MR + CaSO₄ ; P3 : MR + CaCO₃ ; P4 : Vi ; P5 : MR

Les descripteurs « intensité odorante » et « acide » ne sont pas suffisamment discriminants pour former des groupes de produits. Les liqueurs MR + CaCl₂ (P1) et MR + CaSO₄ (P2) sont pour tous les descripteurs dans le même groupe. Ces liqueurs sont similaires et ressemblent à la liqueur réalisée avec l'eau Vi (P4) pour l'ensemble des descripteurs mais pas pour le descripteur « couleur jaune ». Les liqueurs MR + CaCO₃ (P3) et Vi (P4) sont proches uniquement pour le descripteur de la couleur. La liqueur MR (P5) se différencie des autres par les descripteurs « Couleur jaune » et « amer » et se rapproche de la liqueur MR + CaCO₃ sur la base du descripteur « astringent ».

Une ACP a été réalisée en utilisant les cinq descripteurs discriminants. Le descripteur « acide » n'a donc pas été pris en compte. Le cercle de corrélation et le graphique des individus obtenus sont présentés sur la Figure 4.9. Les axes F1 et F2 expliquent 85,19 % de la variance totale.

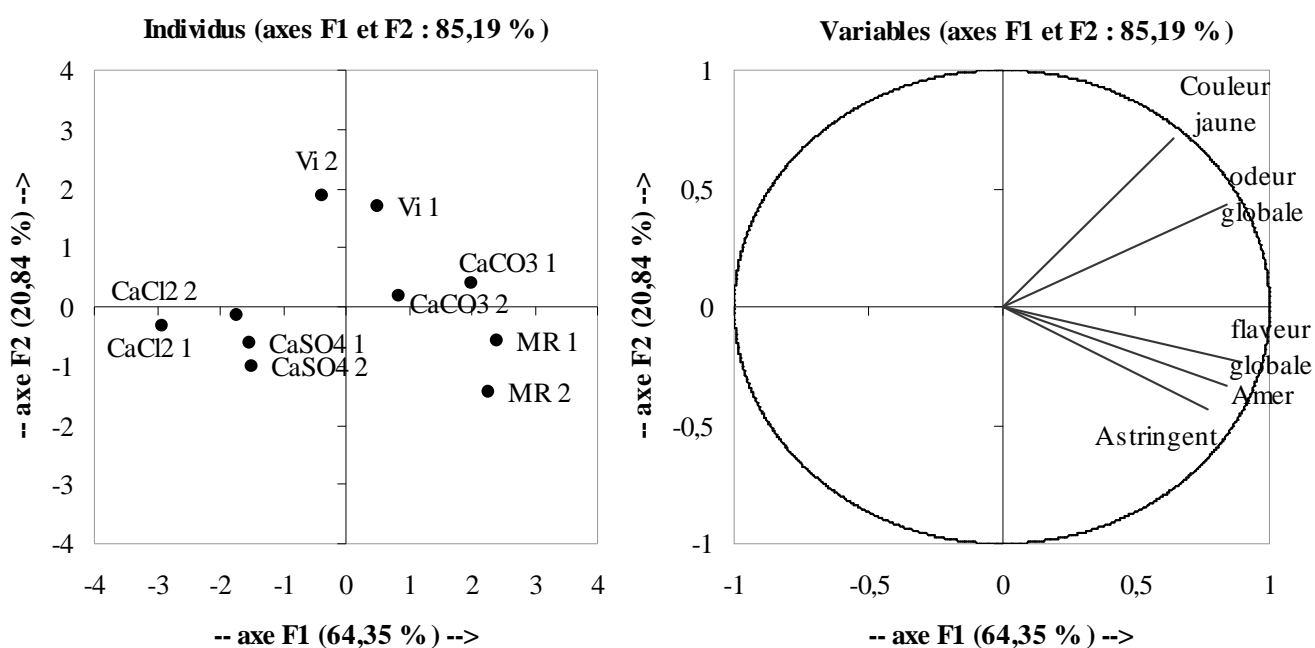


Figure 4.9 : ACP normée sur les six descripteurs et les cinq liqueurs sur les axes F1 et F2.

L'ensemble des descripteurs semble être mieux représenté par l'axe F1. En effet cet axe explique 64,35 % de la variance totale. De plus, lors de l'analyse, nous avons observé des contributions comprises entre 10 et 20 % pour chacun des descripteurs. Cependant, l'axe F2 représente mieux la « couleur jaune » et l'« astringent » (contributions : 42,8 % et 23,6 %

respectivement). Les descripteurs « odeur globale » et « couleur jaune » sont corrélés entre eux, tout comme « astringent », « amer » et « flaveur globale ». D'après ces corrélations et la forte inertie de l'axe F1 (64,35 %), les descripteurs ne permettent pas bien de différencier, ni de caractériser les produits.

D'après le graphique des individus (Figure 4.9), nous pouvons regrouper les liqueurs MR + CaCl₂ et MR + CaSO₄ caractérisées par une couleur jaune clair et par une flaveur, une odeur, une amertume et une astringence peu intense. Le thé préparé avec de l'eau MR est très astringent, amer et riche en flaveur. La liqueur faite avec du CaCO₃ se trouve mal représentée sur les deux axes ; ses contributions sur les axes F1 et F2 sont de 21 % et 2,4 % respectivement. Enfin, la liqueur obtenue avec de l'eau Vi contribue à l'axe F2 (61 %). Elle peut donc être considérée comme ayant une couleur jaune très foncée et très peu astringente.

Ces résultats montrent que les liqueurs préparées avec les eaux « synthétiques » ne présentent pas les mêmes caractéristiques organoleptiques que celle préparée avec l'eau Vi. Les liqueurs préparées avec MR + CaCl₂ et MR + CaSO₄ se rapprochent de celle préparée avec Vi sur la majorité des descripteurs. Cependant deux caractères les séparent, ce sont la couleur jaune et l'odeur globale qui sont plus intenses pour les liqueurs préparées avec Vi. Par contre, la liqueur préparée avec MR + CaCO₃ se rapproche de celle obtenue avec Vi par sa couleur mais aussi par son odeur globale mais s'en éloigne pour tous les autres.

D'après cette étude, les contre-ions, particulièrement les carbonates, jouent un rôle dans l'extraction de certains composés responsables des propriétés organoleptiques du thé. La forte concentration en calcium de l'eau Vi n'explique pas à elle seule les différences observées. Les autres minéraux de cette eau doivent être pris en compte. Afin d'expliquer ces résultats, il nous a semblé important d'identifier les liens existant entre les données sensorielles et physico-chimiques. Cette étude a fait l'objet de la dernière partie de notre travail.

CHAPITRE 5

DISCUSSION

CHAPITRE 5. DISCUSSION	151
5.1. MODIFICATION DE LA COULEUR_____	151
5.2. MODIFICATION DE L'ASTRINGENCE _____	153
5.3. EXTRACTION DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX _____	154
5.4. MODIFICATION DE L'AMERTUME_____	158
5.5. SYNTHÈSE DES MÉCANISMES MIS EN JEU _____	160

Chapitre 5. Discussion

Les résultats de l'analyse sensorielle ont montré que les liqueurs préparées avec les eaux synthétiques ont des caractéristiques gustatives proches de celles préparées avec l'eau Vi. Par contre la couleur et l'intensité odorante globale diffèrent. Le phénomène inverse est observé dans le cas de l'eau MR + CaCO_3 . Le point commun entre l'eau Vi et l'eau MR + CaCO_3 est la valeur du pH plutôt basique. Il semble donc que les variations de la concentration en calcium n'influencent pas directement la couleur et l'intensité odorante globale, le paramètre important dans ce cas étant plus probablement le pH. Afin de vérifier les liens pouvant exister entre les données physico-chimiques et sensorielles, les coefficients de Pearson entre les différents paramètres ont été calculés à l'aide du logiciel XLstat[®] (Microsoft) (Tableau 5.1).

La matrice globale ainsi obtenue confirme l'existence d'une corrélation entre la couleur jaune et le pH des liqueurs. Par contre, l'absence de corrélation entre la concentration en calcium ou l'apport en calcium et les descripteurs gustatifs met de nouveau en évidence que le calcium seul ne peut expliquer les différences organoleptiques ressenties. Le contre-ion doit également être pris en compte. Le descripteur sensoriel le plus influencé par les données physico-chimiques est l'astringence au vu du nombre de corrélations existantes. Viennent ensuite la teneur en polyphénols totaux et la concentration en fer. La quantité de magnésium extrait est corrélée à celles du manganèse et des polyphénols ainsi qu'à l'astringence. À l'opposé, les concentrations en magnésium et en calcium directement mesurées dans les liqueurs ainsi que celles en potassium ne semblent corrélées à aucun autre paramètre. Ces différentes constatations sont détaillées dans la suite de ce chapitre.

5.1. Modification de la couleur

Le contre-ion du calcium ne montre d'effet significatif que s'il influence le pH, cas des carbonates, et n'influence que sur la couleur. Les liqueurs réalisées avec le chlorure de calcium ou le sulfate de calcium sont d'un jaune plus pâle que celles réalisées avec l'eau MR alors que les liqueurs de l'eau MR + CaCO_3 et Vi sont plus foncées. Lorsque le pH augmente, les polyphénols se déprotonent. Or, les formes anioniques sont plus colorées que les formes acides, phénomène observé lors des titrages réalisés en parallèle des mesures de mobilité électrophorétique (cf. Figure 3.25), résultats en accord avec ceux de Liang & Xu (2001).

Tableau 5.1 : Matrice de corrélation globale des données physico-chimiques et sensorielles

X ⁽¹⁾	Ca Brut ⁽²⁾	Ca apport	Mg brut ⁽²⁾	Mg apport	Al ⁽²⁾	Mn ⁽²⁾	Fe ⁽²⁾	K ⁽²⁾	PH	TPC ⁽⁴⁾	CAF	Couleur jaune	O.G. ⁽⁵⁾	F.G. ⁽⁶⁾	Astringent	Amer
Ca brut	1	-0,042	0,115	-0,383	-0,044	-0,437	-0,217	0,051	0,569	-0,357	-0,268	0,190	-0,116	-0,383	-0,288	-0,578
Ca apport	-0,042	1	0,531	0,182	0,698	0,466	0,749	-0,208	0,691	0,521	0,866	0,914	0,993	0,775	0,477	0,631
Mg brut	0,115	0,531	1⁽³⁾	-0,712	-0,203	-0,457	-0,160	-0,354	0,705	-0,404	0,098	0,636	0,539	0,008	-0,480	-0,193
Mg apport	-0,383	0,182	-0,712	1	0,736	0,950	0,783	0,148	-0,396	0,894	0,589	-0,071	0,178	0,680	0,948	0,806
Al	-0,044	0,698	-0,203	0,736	1	0,843	0,957	0,256	0,321	0,930	0,920	0,601	0,695	0,770	0,890	0,833
Mn	-0,437	0,466	-0,457	0,950	0,843	1	0,921	0,034	-0,188	0,954	0,790	0,194	0,466	0,864	0,987	0,937
Fe	-0,217	0,749	-0,160	0,783	0,957	0,921	1	0,012	0,208	0,933	0,941	0,547	0,739	0,920	0,938	0,918
K	0,051	-0,208	-0,354	0,148	0,256	0,034	0,012	1	0,037	0,289	0,111	0,061	-0,136	-0,339	0,066	0,073
pH	0,569	0,691	0,705	-0,396	0,321	-0,188	0,208	0,037	1	-0,020	0,391	0,893	0,673	0,114	-0,106	-0,041
TPC ⁽⁴⁾	-0,357	0,521	-0,404	0,894	0,930	0,954	0,933	0,289	-0,020	1	0,869	0,352	0,540	0,782	0,956	0,938
CAF	-0,268	0,866	0,098	0,589	0,920	0,790	0,941	0,111	0,391	0,869	1	0,742	0,885	0,859	0,790	0,903
Couleur jaune	0,190	0,914	0,636	-0,071	0,601	0,194	0,547	0,061	0,893	0,352	0,742	1	0,921	0,472	0,233	0,395
O.G.	-0,116	0,993	0,539	0,178	0,695	0,466	0,739	-0,136	0,673	0,540	0,885	0,921	1	0,757	0,465	0,660
F.G.	-0,383	0,775	0,008	0,680	0,770	0,864	0,920	-0,339	0,114	0,782	0,859	0,472	0,757	1	0,842	0,890
Astringent	-0,288	0,477	-0,480	0,948	0,890	0,987	0,938	0,066	-0,106	0,956	0,790	0,233	0,465	0,842	1	0,894
Amer	-0,578	0,631	-0,193	0,806	0,833	0,937	0,918	0,073	-0,041	0,938	0,705	0,395	0,660	0,890	0,894	1

(1) : X : variables

(2) : Ca brut, Mg brut, Al, Mn, Fe, K représentent les concentrations totales analysées dans les liqueurs

(3) : les valeurs en gras sont significativement différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha = 0,05$

(4) : TPC : polyphénols totaux

(5) : O.G. : odeur globale

(6) : F.G : flaveur globale

Dans une étude antérieure, il avait été montré qu'un ajout de chlorure de calcium, à une concentration de 270 mg L^{-1} , pouvait induire un changement de couleur de la liqueur vers le rouge (Pangborn *et al.*, 1971). Dans ce travail, nous avons observé ce même changement de couleur pour une liqueur contenant 400 mg L^{-1} . Par contre, pour une concentration inférieure à 200 mg L^{-1} , la couleur obtenue est plus pâle qu'avec de l'eau UP du fait de la diminution de l'extraction de la matière organique. Pour les eaux non tamponnées, *i.e.* en l'absence de carbonates, nous observons donc une diminution de couleur avec l'augmentation de la teneur en calcium libre. Dans le cas des eaux tamponnées, la couleur est plus foncée mais la sorption de calcium sur les feuilles est moins importante. Cette interdépendance entre le calcium et la couleur de la liqueur est en accord avec la valeur du coefficient de Pearson obtenue entre la couleur jaune et l'apport en calcium dans la matrice de corrélation.

5.2. Modification de l'astringence

L'action du calcium sur l'astringence est indirecte. En effet, cet élément limite l'extraction des polyphénols. Ce sont ces derniers qui sont corrélés à l'astringence. Cette modification de l'extraction des polyphénols pourrait être due à la grande affinité du calcium pour les composés pariétaux, notamment les pectines. Il pourrait ainsi en résulter une modification de la structure de la paroi des feuilles de thé et donc une limitation des échanges (Capel *et al.*, 2006).

Par ailleurs, l'analyse HPLC-MS a permis de mettre en évidence une très forte diminution des concentrations en polyphénols dans les liqueurs préparées à partir de l'eau Vi, après leur filtration à $0,45 \text{ }\mu\text{m}$, en particulier pour l'EGCG. Or cette catéchine est un des principaux composés responsables de la formation de crème. Une hypothèse simple serait de supposer que l'étape de filtration pourrait conduire à sa rétention sur les membranes. Cependant, lors des analyses de résonance magnétique en *excitation sculpting* sur la liqueur non filtrée, nous avons observé une forte diminution de l'intensité du signal dans la région caractéristique des polyphénols ce qui conduit à mettre en doute cette hypothèse. Spiro et ses collaborateurs (1987a; 1987b; 1987) avaient mis en avant une diminution de l'extraction de 9 % pour les théaflavines et 12 % pour la caféine dans une eau contenant du CaCl_2 avec $I = 110 \text{ mmol L}^{-1}$ par rapport à l'eau UP. Dans notre travail, la diminution de l'extraction des polyphénols totaux est de l'ordre de 40 % dans le cas des eaux Vi et MR + CaCl_2 dont les forces ioniques sont respectivement 20 et 15 mmol L^{-1} . Pour la caféine, la diminution est de 23 %. De plus, les études de Spiro *et al.* (1987a, b) portaient sur des feuilles dont le grade était *Pekeo*

Fannings alors que le thé M8 est de grade FTGFOP, c'est-à-dire des feuilles entières. Nos résultats permettent donc de mettre en avant que, dans le cas de feuilles entières, la diminution de l'extraction due à la présence de calcium existe dans des proportions beaucoup plus importantes.

Avec l'eau MR + CaCO_3 , nous avons mis en évidence que les polyphénols conservent leurs propriétés astringentes quelle que soit la valeur du pH. Dans le cas des liqueurs préparées avec les eaux fortement minéralisées, la plus faible astringence peut être due à la diminution de leur extraction mais aussi à l'augmentation de la force ionique. Cette dernière pourrait favoriser les interactions hydrophobes entre les molécules d'EGCG présentes dans le milieu et donc diminuer leur interaction avec les protéines salivaires et ainsi la sensation d'astringence. Cette hypothèse a déjà été proposée par Pascal (2006).

La corrélation liant l'astringence et la concentration en aluminium est cohérente. En effet, cet élément est largement cité pour ses propriétés astringentes dans la littérature spécialisée dans le domaine sensoriel (International Organisation for Standardisation, 1975).

5.3. Extraction des éléments minéraux

Les coefficients de corrélations liant les concentrations en aluminium, en fer et en manganèse avec la teneur en polyphénols totaux valent respectivement 0,930, 0,954 et 0,933. Ces corrélations mettent en avant l'aptitude de ces composés à se complexer ainsi qu'à être extraits conjointement. En effet, la cartographie de feuilles de thé entières a montré une répartition non régulière des divers éléments minéraux et leur présence sous des formes chimiques différentes (Carr *et al.*, 2003). Par exemple, le potassium semble être réparti équitablement dans les différents compartiments cellulaires de la feuille alors que l'aluminium et le calcium sont très présents dans les parois cellulaires. De plus, le calcium est également présent, au sein du mésophile, sous forme de cristaux dont la composition chimique n'a pas encore été exactement déterminée. La présence de ces cristaux pourrait expliquer la faible solubilité du calcium dans le cas des eaux UP ou MR. Au sein des parois cellulaires, la spéciation de l'aluminium consisterait majoritairement en complexes avec les catéchines et les acides organiques et phénoliques (Nagata *et al.*, 1992). Les réactions de complexation dans cette partie de la feuille pourraient expliquer la forte influence du calcium sur l'extraction de cet élément. En effet, le calcium influence l'extraction de la matière organique et donc si l'aluminium est lié à cette matière organique, il semble logique que son extraction soit modifiée d'une manière similaire. Le thé au citron constitue un cas particulier

pour lequel le rendement d'extraction de l'aluminium reste relativement constant. Ceci est certainement lié aux écorces de citron et aux arômes ajoutés par le fournisseur. Il en résulte la présence des acides citrique (CitH_3) et ascorbique (AscH_2) en excès qui forment des complexes successifs avec l'aluminium. Les constantes de formation de ces complexes sont reportées dans le Tableau 5.2. L'adjonction de ces additifs a pour effet de diminuer le pH dans le cas des eaux peu ou pas tamponnées mais surtout de réguler la complexation de l'aluminium en contrôlant sa forme libre (Sigg *et al.*, 2000).

Tableau 5.2 : Constantes de protonation et de complexation de l'aluminium avec les acides ascorbique et citrique

	Ligands	$\text{Log } \beta^{(1)}$	
		(Martell & Smith, 1977; 1989)	
		AscH_2	CitH_3
Équilibres de complexation avec l'aluminium	$[\text{AlL}]/[\text{Al}][\text{L}]$	–	7,98
	$[\text{AlLH}]/[\text{Al}][\text{LH}]$	1,89	5,21
	$[\text{Al}(\text{LH})_2]/[\text{Al}][\text{LH}]^2$	3,55	–

(1) : $\log \beta$ à 25 °C pour $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$

Les métaux en solution, notamment l'aluminium et le fer, sont, en fonction de leur état d'oxydation et du pH, présents sous forme de cations libres ou d'hydroxy-complexes, en équilibre avec leurs hydroxydes ou oxydes. La répartition des espèces de l'aluminium et du fer peut-être décrite par le diagramme de Sillén représentant $\log [X]$ en fonction du pH où $[X]$ est la concentration des différentes espèces de formule $[\text{Me}(\text{OH})_m^{(3-m)+}]$ pour m variant entre 0 et 4. Ces diagrammes ont été tracés à partir des constantes reportées en Annexe 6, et des concentrations totales mesurées dans les liqueurs (Figures 5.1 et 5.2). Ces tracés permettent également de montrer pourquoi il ne peut exister de corrélation entre l'extraction du fer et de l'aluminium et le pH. En effet, lorsque le pH augmente, la concentration totale en ces deux éléments décroît dans un premier domaine pour atteindre un minimum avant de croître pour des pH plus élevés.

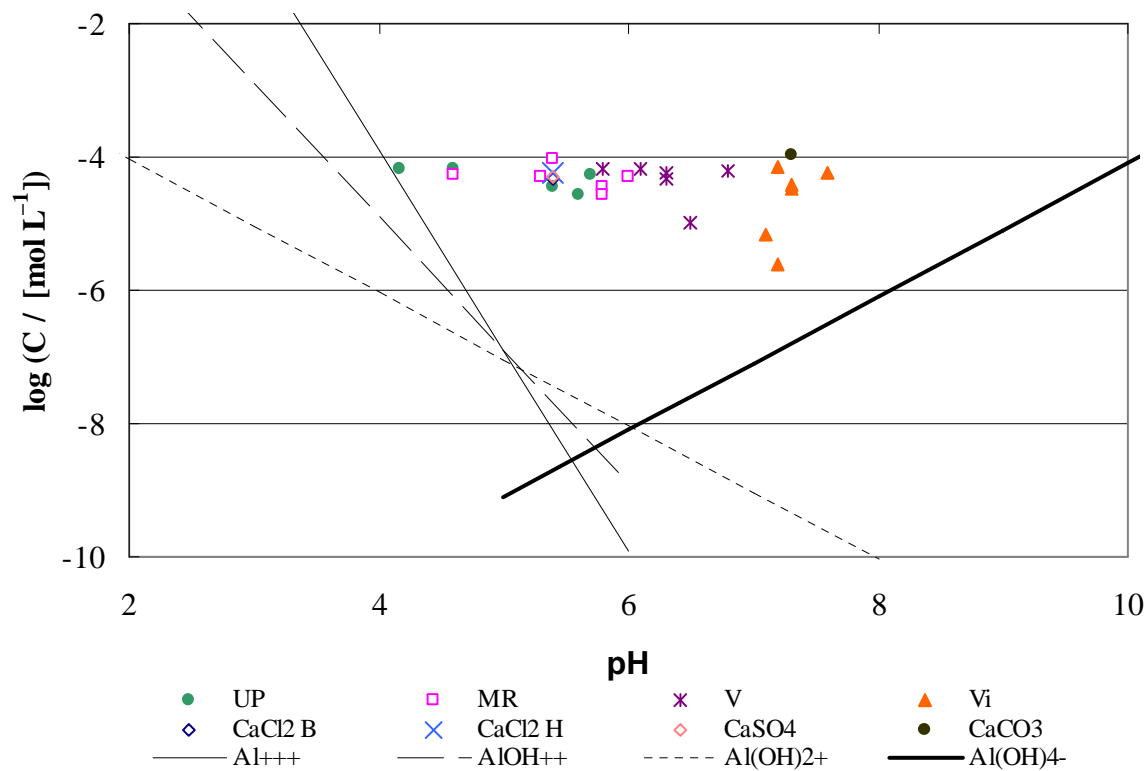


Figure 5.1 : Représentation de $\log([Al]_T)$ en fonction du pH pour toutes les liqueurs étudiées

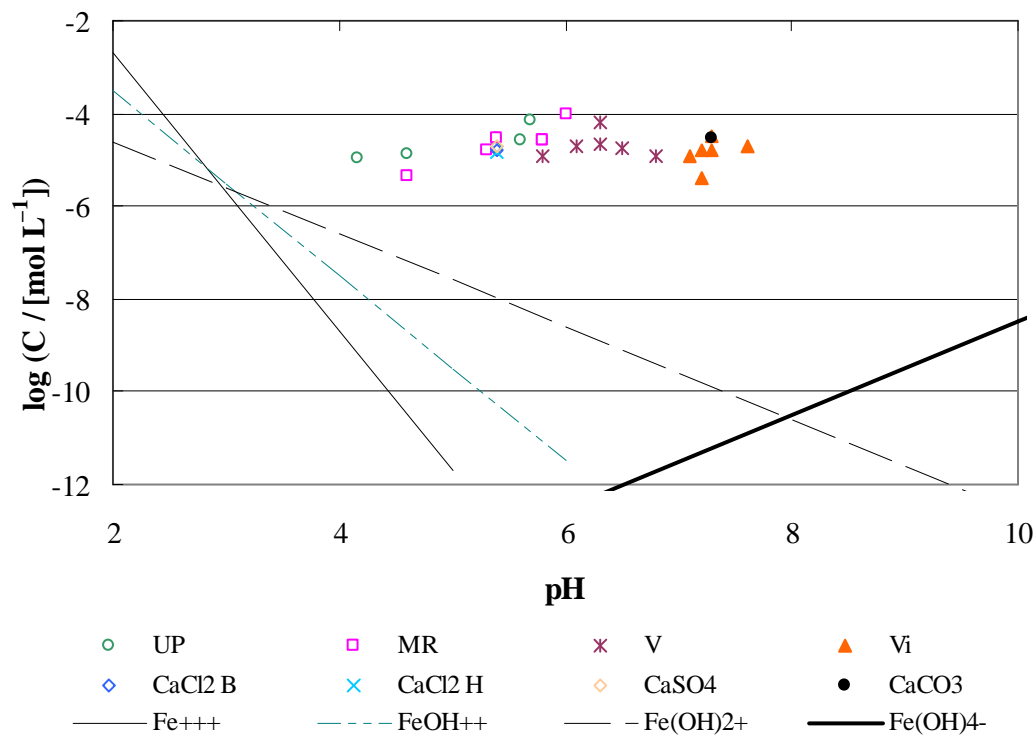


Figure 5.2 : Représentation de $\log([Fe]_T)$ en fonction du pH pour toutes les liqueurs étudiées

Pour ces deux éléments, les concentrations totales dans la phase dissoute sont systématiquement plus élevées que la limite de solubilité des oxyhydroxydes. La différence peut être attribuée à la formation de complexes avec les ligands organiques principalement présents, tels que les polyphénols, augmentant ainsi leur solubilité. L'augmentation de la solubilité est en accord avec des analyses antérieures ayant montré que ces éléments peuvent être complexés avec la matière organique du thé (Jovanovic *et al.*, 1998). Cette hypothèse est corroborée par les valeurs de conductivité. Ainsi, la variation de conductivité entre les eaux minéralisées et les liqueurs est vraiment minime comparée à la concentration analysée en potassium. En effet, la valeur de la conductivité pour une telle concentration devrait être d'environ $500 \mu\text{S cm}^{-1}$ alors que la variation entre l'eau Vi chauffée et la liqueur n'est que de $281 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Dans le cas de l'aluminium, il faut aussi tenir compte de la présence des ions fluorures, à des concentrations non négligeables dans les liqueurs (Spiro & Lam, 1995). Pour le confirmer, des simulations à l'aide du logiciel Visual Minteq® (disponible à l'adresse <http://www.lwr.kth.se/English/OurSoftware/vminteq/>) ont été réalisées. Les composants considérés, composants définis par Morel (1983) sont l'aluminium, le calcium et les polyphénols. Les calculs sont réalisés pour l'ensemble des espèces dont les constantes de complexation sont connues (annexes 6 et 7). Les concentrations totales utilisées pour ces calculs sont celles obtenues lors des analyses des liqueurs MRM8 et ViM8. Concernant les fluorures, la concentration a été fixée à 20 mg L^{-1} , teneur analysée par chromatographie anionique (résultat non montré).

Les résultats (Figure 5.3) montrent que la spéciation de l'aluminium varie fortement avec le pH. En effet dans le cas des deux liqueurs, nous pouvons observer que, lorsque le pH est inférieur à 7 (cas de la liqueur MRM8), l'aluminium est préférentiellement complexé avec les fluorures alors que pour les pH basiques (cas de la liqueur ViM8), il l'est avec les polyphénols. Ces résultats permettent de mettre en avant l'importance des études de spéciation de l'aluminium quant à sa biodisponibilité au sein des infusions de thé. Pour compléter ce travail, les valeurs des constantes de complexation entre les autres éléments (*i.e.* le calcium, le fer, le manganèse) et les polyphénols devraient être prise en compte mais elles ne sont pas connues à ce jour.

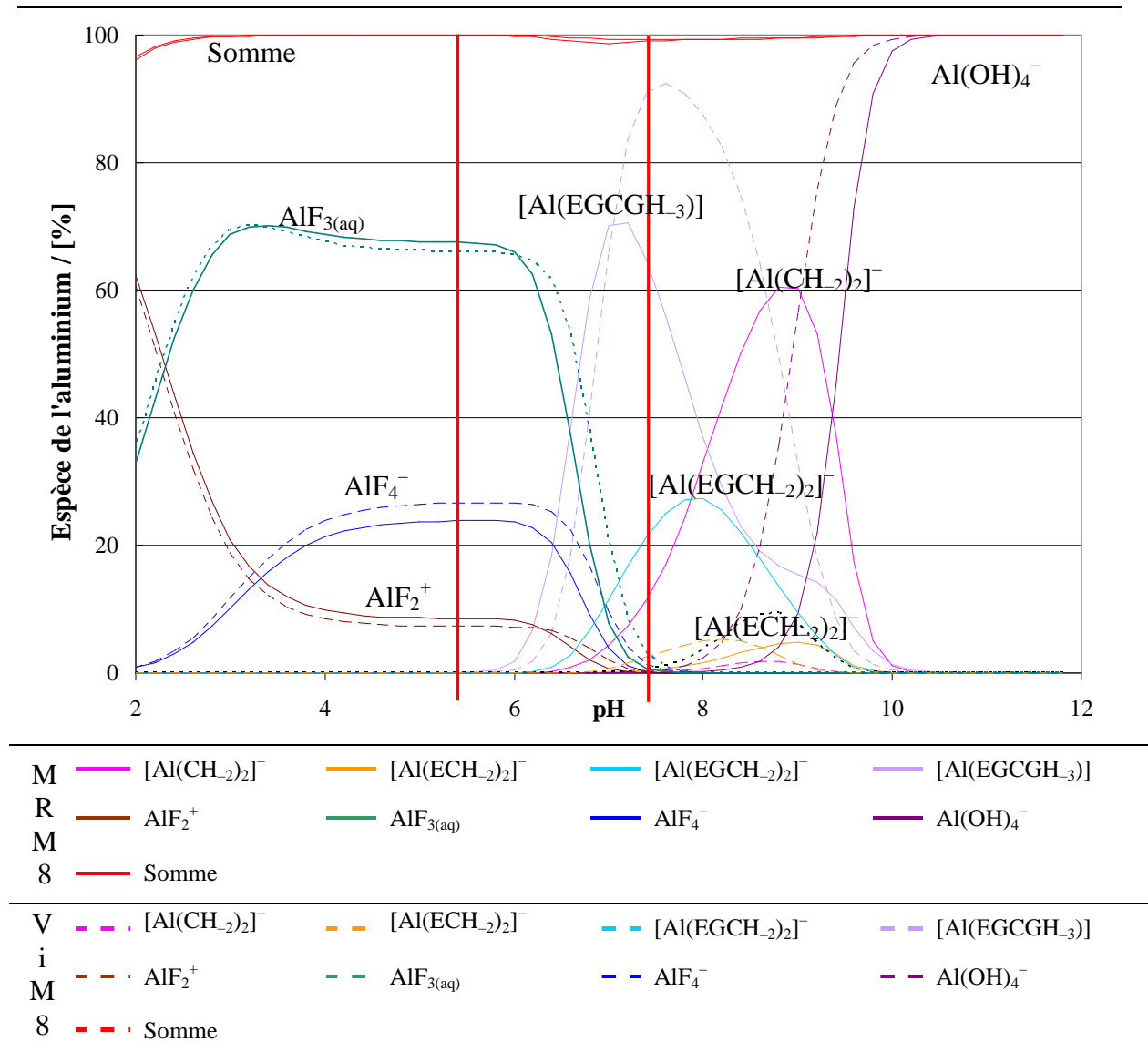


Figure 5.3 : Spéciation de l'aluminium dans les liqueurs en fonction du pH (logiciel Minteq®). Les compositions prises en compte sont celle de MRM8 pour les traits pleins et celle de ViM8 pour les pointillés. Chaque trait rouge vertical matérialise le pH de la liqueur MRM8 (5,4) ou de celle ViM8 (7,6)

5.4. Modification de l'amertume

Outre l'astringence, les polyphénols possèdent également des propriétés amères confirmant la corrélation ($r = 0,938$) entre l'amertume et leur teneur totale (TPC). De plus, pour ce descripteur, le composé d'intérêt est la caféine. Les liqueurs réalisées avec l'eau MR présentent une amertume supérieure à celle des eaux riches en calcium. Cette observation est en accord d'une part avec la diminution de l'extraction de la caféine observée lors de la présence de calcium dans l'eau lors des analyses par chromatographie HPLC-UV-MS et par RMN et d'autre part avec la corrélation observée entre la caféine et l'amertume. Les analyses

par RMN des liqueurs de thé non filtrées ont révélé une variation des déplacements chimiques des protons de la caféine selon l'eau utilisée. Cette variation affecte principalement le déplacement chimique du proton H-8 de la caféine puisqu'il varie de $-0,060$ ppm dans la liqueur avec l'eau Vi et de $-0,100$ ppm dans celle avec l'eau UP par rapport à celui de la caféine seule en solution (cf. Tableau 3.26). La caféine est une molécule pouvant former des empilements en solution sous forme de dimères, trimères..., qui entraînent une variation du déplacement chimique des protons des groupements méthyles trois fois supérieure à celle observée pour le proton H-8 (Charlton *et al.*, 1999). Ceci permet de conclure qu'au sein des liqueurs de thé, l'évolution des déplacements chimiques des protons de la caféine n'est pas due à un effet d'empilement mais plutôt à la présence d'interactions avec d'autres molécules. Par ailleurs, une étude antérieure par RMN dans D_2O a montré que plus la variation du déplacement chimique est importante, plus la caféine semble complexée avec les formes gallatées des catéchines (EGCG et ECG) (Hayashi *et al.*, 2004). Ainsi, il semblerait que la complexation de la caféine se produise de préférence au moyen du cycle à trois atomes, contrairement à la dimérisation. La plus faible variation du déplacement chimique dans le cas de l'eau Vi est, de plus, en accord avec la diminution de la quantité de polyphénols extraits qui entraînerait par conséquent une diminution des interactions. Toutefois, cette plus faible variation est surprenante car c'est au sein de cette liqueur que la crème de thé est la plus visible ce qui aurait pu signifier une plus forte complexation de la caféine. Pour cette eau, une partie du lyophilisat est restée insoluble lors de sa re-solubilisation dans D_2O pour réaliser la quantification de la caféine. Les composés mis en jeu dans le culot doivent être les théaflavines ou théarubigines. En effet, les pics entre 6 et 7 ppm caractéristiques de ces composés, présents lors de l'analyse directe en *excitation sculpting* (Bonnely *et al.*, 2003) étaient absents après la reprise dans D_2O (Figure 5.4).

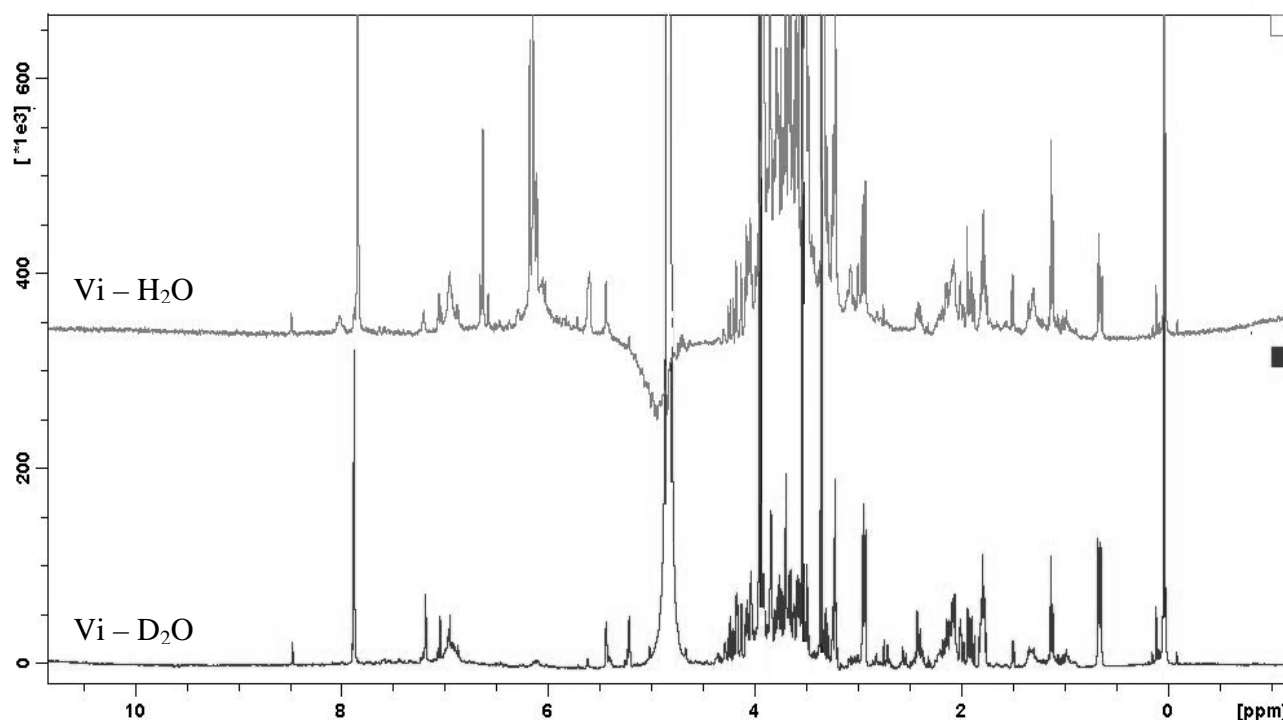


Figure 5.4 : Comparaison des spectres RMN de la liqueur ViM8 obtenus soit directement en *excitation sculpting*, soit après lyophilisation et reprise de la phase solide dans D_2O

Ainsi, cet ensemble de composés insolubles pourrait « piéger » en son sein des éléments minéraux, comme le potassium, n’ayant normalement pas d’affinité particulière pour les espèces organiques. Ce phénomène serait favorisé par des valeurs de force ionique élevées, ce qui entraînerait le repliement des macromolécules organiques.

5.5. Synthèse des mécanismes mis en jeu

Le schéma de la figure 1.4 rassemble les nombreux mécanismes d’échanges existant lors de l’infusion de feuilles de thé dans une eau non minéralisée (tracé en noir dans la Figure 5.5) et dans une eau riche en calcium avec/ ou sans hydrogénocarbonates (tracé en rouge dans la Figure 5.5) qui ont été mis en évidence lors de cette étude. D’un point de vue temporel, la première étape consiste en la réhydratation des feuilles, phase durant laquelle le calcium de l’eau pourrait être sorbé et donc limiter, par la suite, l’extraction des différents composés, organiques et inorganiques (**A** dans la Figure 5.5). Le calcium intervient également dans les mécanismes de complexation entre les différentes molécules organiques au sein même des liqueurs. Il semble neutraliser partiellement ou totalement les charges de surface des colloïdes et donc favoriser la floculation (**B** dans la Figure 5.5). Par ailleurs, la plus forte complexation entre la caféine et les polyphénols dans les liqueurs ne semble pas intervenir directement sur

les propriétés organoleptiques puisque la diminution de l'astringence pourrait s'expliquer par la diminution de l'extraction des polyphénols. Un autre paramètre important est la capacité à neutraliser les acides des eaux utilisées. Que les eaux contiennent des hydrogénocarbonates libres en présence de calcium ou sous forme de calcite, ces contre-ions ont un effet sur la couleur des liqueurs (Figure 5.5).

En outre, l'apport en calcium apparaît corrélé à l'odeur globale ainsi qu'à la couleur jaune. Ce lien est en accord avec la corrélation observée entre les descripteurs « couleur jaune » et « odeur globale » lors de l'analyse ACP des données sensorielles (Figure 4.9). Ceci montre donc que le calcium semble également influencer l'extraction des composés volatils. Les mécanismes responsables de cet effet ne sont pas encore connus et devront faire l'objet de travaux supplémentaires.

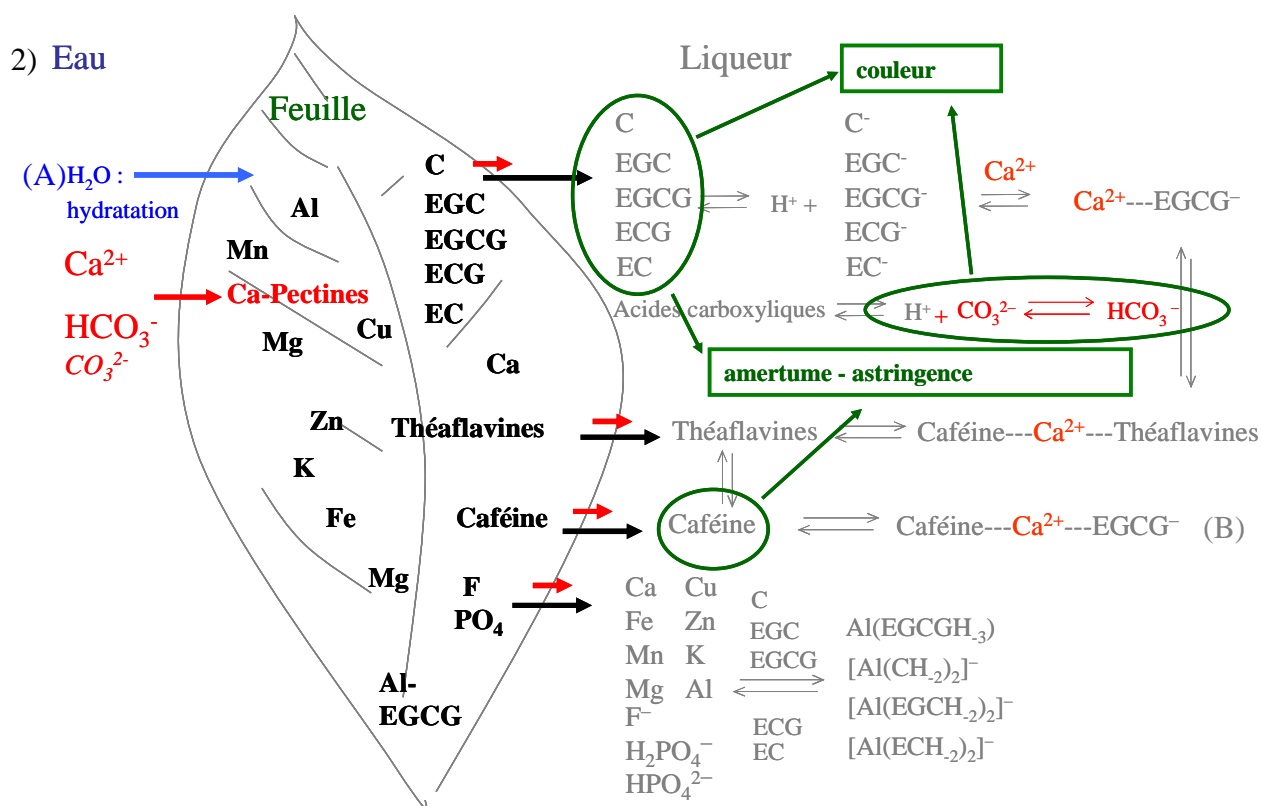
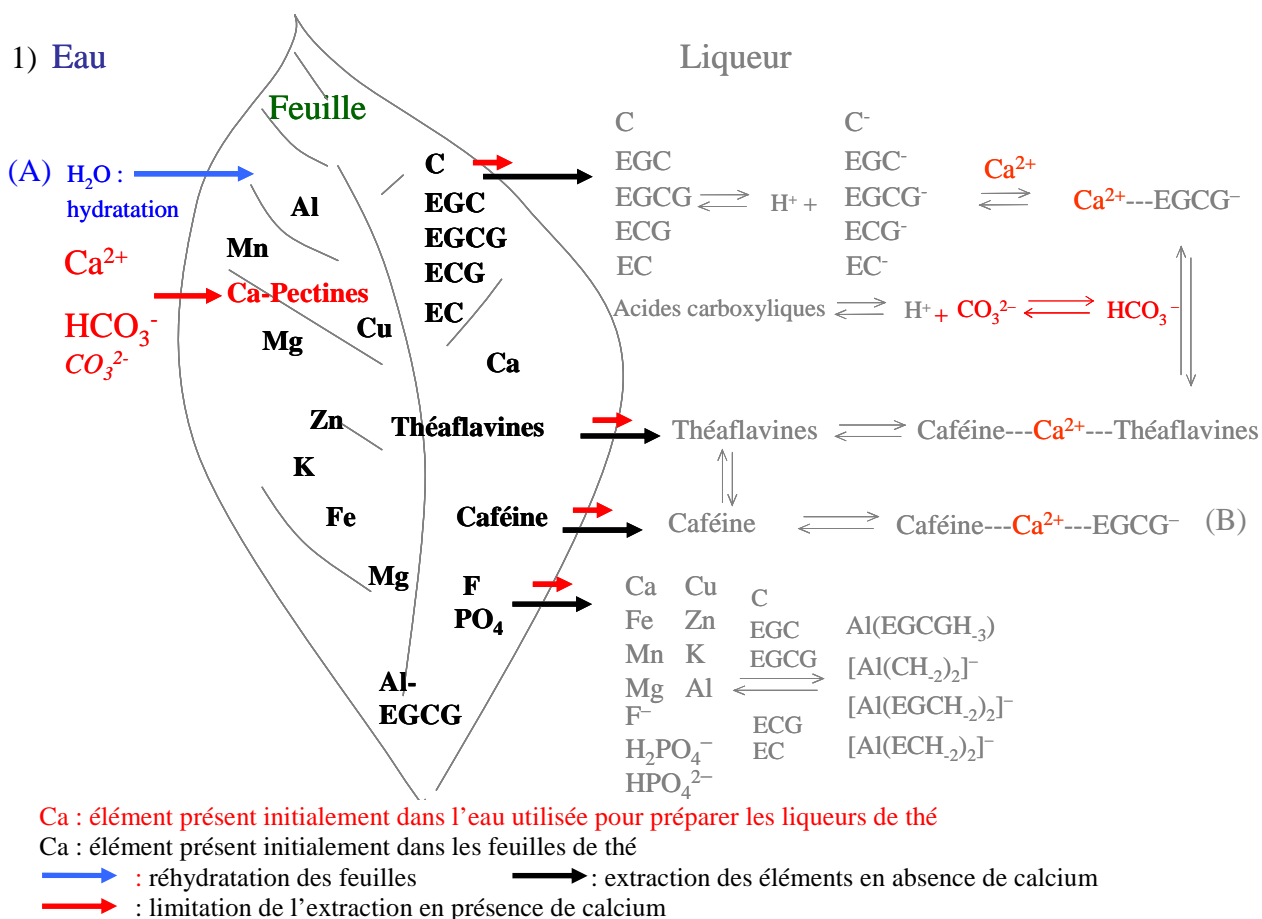


Figure 5.5 : 1) Bilan des réactions durant l'extraction de feuilles de thé dans une eau calco-carbonique ou non et 2) leurs conséquences sur les propriétés organoleptiques

CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

Cette étude a permis de mieux comprendre l'influence de la nature du thé et des paramètres physico-chimiques de l'eau sur l'extraction des composés organiques et minéraux. La relation entre ces paramètres et les propriétés organoleptiques des liqueurs a été mise en évidence. Un mécanisme global d'échanges des composés entre la feuille et la liqueur a été proposé.

Les résultats de l'étude ont confirmé que la présence de calcium dans l'eau conduit à une diminution de l'extraction des polyphénols totaux. Par ailleurs, pour avoir un effet, le calcium doit être dissous et sous forme libre. La présence de cet élément dans l'eau influence également l'extraction des éléments minéraux comme l'aluminium, le fer et le manganèse. Cette modification de l'extraction pourrait être expliquée par la grande affinité du calcium pour les composés pariétaux constitutifs de la feuille de thé comme les pectines.

Le calcium intervient donc durant l'infusion des feuilles de thé mais également au sein même de la liqueur en modifiant les mécanismes de complexation. Dans la liqueur, il favorise la complexation en neutralisant les charges de surface dues à la dissociation des polyphénols.

En ce qui concerne les qualités organoleptiques, le calcium semble influencer l'odeur globale et la couleur des liqueurs mais ne suffit pas à expliquer directement les différences observées concernant l'amertume et l'astringence. Dans ce cas, la diminution de l'extraction des polyphénols semble le paramètre influent, ceci étant indirectement lié à la présence du calcium. Le contre-ion du calcium n'intervient que s'il influence le pH et donc la couleur des liqueurs par son effet sur la dissociation des polyphénols.

L'influence de l'eau sur la complexation de la caféine et des polyphénols n'a pas pu être totalement élucidée. En ce sens les analyses RMN, abordées de manière préliminaire dans ce travail, semblent pouvoir apporter des éléments intéressants. Il serait donc particulièrement intéressant de les compléter par l'étude de l'influence de l'eau sur les interactions entre la caféine et les polyphénols à l'aide de solutions modèles contenant de la caféine et des polyphénols afin de confirmer que la variation du déplacement chimique de la caféine est effectivement due à la présence des polyphénols.

Par la suite, il serait également intéressant d'étudier directement la feuille afin de déterminer les espèces présentes aux différents stades de l'infusion. L'émergence de nouvelles technologies comme par exemple l'ablation-laser/ICP-MS pourrait répondre à ces questions. Cette technique analytique permet d'analyser les feuilles entières et donc de déterminer la

répartition des éléments en surface et au sein de la feuille par étude de profils à différentes profondeurs. Des tests préliminaires ont été effectués et ont permis de tester la faisabilité de telles analyses sur les feuilles de thé et sont prometteurs pour la suite, notamment pour l'analyse du calcium. Cet élément jouant un rôle prépondérant dans les mécanismes d'échanges feuille-liqueur, ceci pourrait permettre de déterminer si le calcium est déposé en surface ou s'il pénètre plus profondément dans la structure de la feuille et ainsi mieux comprendre les mécanismes responsables de sa sorption durant l'infusion dans une eau dure. Un autre moyen de tracer le calcium au sein de la feuille pourrait être l'utilisation de la technique du marquage isotopique du calcium (isotope 42).

De plus, l'étude des composés pariétaux suite à des extractions successives réalisées sur les feuilles sèches puis l'analyse de ces composés au sein même des différentes liqueurs pourrait aider à identifier les molécules mises en jeu lors de la sorption du calcium. Un des facteurs importants pourrait être le degré de méthylation des pectines présentes dans les feuilles. De plus, un autre paramètre important pourrait être la modification du caractère hydrophile ou hydrophobe des molécules au sein de la feuille. Cette modification pourrait être suivie grâce à la mesure de l'angle de goutte.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alberti, G., Biesuz, R., Profumo, A. & Pesavento, M. (2003). Determination of the total concentrations and speciation of Al(III) in tea infusions. *J. Inorg. Biochem.*, 97: 79-88.
- Anderson, W., Hollins, J. G. & Bond, P. S. (1971). The composition of tea infusions examined in relation to the association between mortality and water hardness. *J. Hyg.*, 69 (1): 1-15.
- Arce, L., Rios, A. & Valcarcel, M. (1998). Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system. *J. Chromatogr., A*, 827: 113-120.
- Association Française de Normalisation (1992). Analyse sensorielle - Vocabulaire. ISO 5492 V00-150, 22 p.
- Association Française de Normalisation (1999). Analyse sensorielle - Guide général pour l'évaluation sensorielle - Description, différenciation et mesure hédonique. XP V09-501, 18 p.
- Astill, C., Birch, M. R., Dacombe, C., Humphrey, P. G. & Martin, P. T. (2001). Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (11): 5340-5347.
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G. & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.*, 89 (1): 27-36.
- Axelos, M. A. V. & Thibault, J. F. (1991). The chemistry of low-methoxyl pectin gelation. *Chem. Technol. Pectin*: 109-118.
- Bonnely, S., Davis, A. L., Lewis, J. R. & Astill, C. (2003). A model oxidation system to study oxidised phenolic compounds present in black tea. *Food Chem.*, 83 (4): 485-492.
- Boursin, J.-I. (1981). *Méthodes statistiques de la gestion*, Vuibert Gestion, Vuibert, Paris, 120 p.
- Braconnot, H. (1825). Recherche sur un nouvel acide universellement répandu dans tous les végétaux. *Annale de Chimie et de Physique*, 2 (28): 173-178.
- Buffle, J. (1988). *Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach*, Ellis Horwood, Chichester, 692 p.
- Cai, Y., Gaffney, S. H., Lilley, T. H., Magnolato, D., Martin, R., Spencer, C. M. & Haslam, E. (1990). Polyphenol interactions. Part 4. Model studies with caffeine and cyclodextrins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 12: 2197-2209.
- Capel, F., Nicolai, T., Durand, D., Boulenguer, P. & Langendorff, V. (2006). Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. *Food Hydrocoll.*, 20 (6): 901-907.
- Carr, H. P., Lombi, E., Kupper, H., McGrath, S. P. & Wong, M. H. (2003). Accumulation and distribution of aluminium and other elements in tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Agronomie*, 23 (8): 705-710.
- Chao, Y. C. & Chiang, B. H. (1999a). Cream formation in a semifermented tea. *J. Sci. Food. Agric.*, 79 (13): 1767-1774.
- Chao, Y. C. & Chiang, B. H. (1999b). The roles of catechins and caffeine in cream formation in a semi-fermented tea. *J. Sci. Food. Agric.*, 79 (12): 1687-1690.
- Charlton, A. J., Davis, A. L., Jones, D. P., Lewis, J. R., Davies, A. P., Haslam, E. & Williamson, M. P. (1999). The self-association of the black tea polyphenol theaflavin and its complexation with caffeine. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2: 317-322.

- Chen, A. O., Tsai, Y. S. & Chiu, W. T. F. (1993). The shelf-life of tea in *Shelf-life studies of foods and beverages: Chemical, Biological, physical and nutritional aspects*. Ed. G. Charalambou. Elsevier science Ltd., 1224 p.
- Civille, G. V. & Lyon, B. G. (1996). *Aroma and Flavor Lexicon for Sensory Evaluation: Terms, Definitions, References, and Examples*. American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, 158 p.
- Collier, P. D., Mallows, R. and Thomas, P.E. (1972). Interactions Between Theaflavins, Flavanols and Caffeine. *Phytochem.*, 11: 867.
- Dalluge, J. J., Nelson, B. C., Brown Thomas, J. & Sander, L. C. (1998). Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., A*, 793 (2): 265-274.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M. E. J., Brighenti, F. & Crozier, A. (2004). HPLC-MSn Analysis of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids in Green and Black Tea. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (10): 2807-2815.
- Delmas, F.-X. & Minet, M. (2007). *Le guide de dégustation de l'amateur de thé*. Les éditions du Chêne, Paris, 239 p.
- Dupas, C. J., Marsset-Baglieri, A. C., Ordonaud, C. S., Ducept, F. M. G. & Maillard, M.-N. (2006). Coffee antioxidant properties: effects of milk addition and processing conditions. *J. Food Sci.*, 71 (3): S253-S258.
- Erdemgil, F. Z., Sanli, S., Sanli, N., Oezkan, G., Barbosa, J., Guiteras, J. & Beltran, J. L. (2007). Determination of pKa values of some hydroxylated benzoic acids in methanol-water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. *Talanta*, 72 (2): 489-496.
- FAO (2006). Situation actuelle du marché du thé et perspectives à moyen terme. Groupe Intergouvernemental sur le thé, Nairobi, 1-13 p.
- FAO. (2007). Production / ProdStat / Crops. by Food and Agriculture Organisation of the United Nations from <http://faostat.fao.org/>.
- Fenema, O. R. (1996). Water and Ice in *Food Chem.* Ed. O. R. Fennema. Marcel Dekker, Inc., New York, 17-95 p.
- Flaten, A. K. & Lund, W. (1997). Speciation of aluminium in tea infusions studied by size exclusion chromatography with detection by post-column reaction. *Sci. Total Environ.*, 207: 21-28.
- Flaten, T. P. (2001). Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res.*, 55 (2): 187-196.
- Flaten, T. P. (2002). Aluminium in tea. Concentrations, speciation and bioavailability. *Coord. Chem. Rev.*, 228 (2): 385-395.
- French, P., Gardner, M. J. & Gunn, A. M. (1989). Dietary Aluminium and Alzheimer's disease. *Food Chem. Toxicol.*, 27: 495.
- GEMS. (2007). GEMS Water Programm : Annual Statistics Data. by United Nations from <http://www.gemswater.org/>.
- Goodsall, C. W., Hodges, R. C., Jones, T. G., Mawson, J. D. & Stabler, P. J. (1999). Tea manufacture. Application: WO, Unilever Plc, UK; Unilever N.V.; Hindustan Lever Limited.
- Goodwin, T. W. (1965). *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Academic Press Inc., London, 583 p.
- Harbron, R. S., Ottewill, R. H. & Bee, R. D. (1989). The colloid chemistry of black tea. *Spec. Publ. - R. Soc. Chem.*, 75 (Food Colloids): 283-294.

- Haslam, E. (1998). *Practical Polyphenolics: from Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*, Cambridge University Press, Cambridge, 438 p.
- Haslam, E. (2003). Thoughts on thearubigins. *Phytochem.*, 64 (1): 61-73.
- Hayashi, N., Ujihara, T. & Kohata, K. (2004). Binding energy of tea catechins/caffeine complexes in water evaluated by titration experiments with ^1H -NMR. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 (12): 2512-2518.
- Holysz, L., Chibowski, M. & Chibowski, E. (2002). Time-dependent changes of zeta potential and other parameters of in situ calcium carbonate due to magnetic field treatment. *Colloids Surf. A.*, 208 (1-3): 231-240.
- Huang, M. T., Ho, C.-T. & Lee, C. Y. (1992). Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health II: Antioxidants and Cancer Prevention in *American Chemical Society Symposium Series 507*. Ed. American Chemical Society, Washington DC. 507, 8-34 p.
- Hunter, R. J. (1981). *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*. Academic Press, London, UK, 386 p.
- Inoue, M. B., Inoue, M., Fernando, Q., Valcic, S. & Timmermann, B. N. (2002). Potentiometric and ^1H NMR studies of complexation of Al^{3+} with (-)-epigallocatechin gallate, a major active constituent of green tea. *J. Inorg. Biochem.*, 88 (1): 7-13.
- International Organisation for Standardisation (1975). Analyse sensorielle. Méthodologie. Méthode d'éveil à la sensibilité gustative. V09-002, 13 p.
- International Organisation for Standardisation (1981). Tea - Preparation of liquor for use in sensory tests. ISO 3103:1980, 4 p.
- International Organisation for Standardisation (1982). Black tea - Vocabulary. ISO 6078:1982, 22 p.
- International Organisation for Standardisation (1988). Analyse sensorielle. Méthodologie. Guide général pour la sélection, l'entraînement et le contrôle des sujets qualifiés. V09-003, 22 p.
- International Organisation for Standardisation (1994). Analyse sensorielle. Recherche et sélection de descripteurs pour l'élaboration d'un profil sensoriel, par approche multidimensionnelle. 11035:1994, 36 p.
- IUPAC (1987). Recommendations for the definition, estimation, and use of the detection limit. *Analyst*, 112 (2): 199-204.
- Jaganyi, D. & Price, R. D. (1998). Kinetics of tea infusion: the effect of the manufacturing process on the rate of extraction of caffeine. *Food Chem.*, 64 (1): 27-31.
- Jöbstl, E., Fairclough, J. P. A., Davies, A. P. & Williamson, M. P. (2005). Creaming in black tea. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (20): 7997-8002.
- Jovanovic, S. V., Hara, Y., Steenken, S. & Simic, M. G. (1995). Antioxidant potential of gallic catechins. A pulse radiolysis and laser photolysis study. *Journal of American Chemical Society*, 117 (39): 9881-9888.
- Jovanovic, S. V., Simic, M. G., Steenken, S. & Hara, Y. (1998). Iron complexes of gallic catechins. Antioxidant action or iron regulation? *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (11): 2365-2370.
- Keijbets, M. J., Pilnik, W. & Vaal, J. F. A. (1976). Model studies on behavior of pectic substances in the potato cell wall during boiling. *Potato Res.*, 19: 289-303.
- Kennedy, J. A., Munro, M. H. G., Powell, H. K. J., Porter, L. J. & Foo, L. Y. (1984). The protonation reactions of catechin, epicatechin and related compounds. *Aust. J. Chem.*, 37 (4): 885-892.
- Kooijmans, J. (1940). Is de samenstelling van leidingwater van invloed bij de vliesvorming op thee ? *Water (Neth.)*, 24: 65-67.

- Kralj, B., Krizaj, I., Bukovec, P., Slejko, S. & Milacic, R. (2005). Speciation of aluminium in tea infusions by use of SEC and FPLC with ICP-OES and ES-MS-MS detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 383 (3): 467-475.
- Kumamoto, M., Sonda, T., Nagayama, K. & Tabata, M. (2001). Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65 (1): 126-132.
- Lagarde, J. (1983). *Initiation à l'analyse des données*, Dunod, Paris, 157 p.
- Lakenbrink, C., Lapczynski, S., Maiwald, B. & Engelhardt, U. H. (2000). Flavonoids and Other Polyphenols in Consumer Brews of Tea and Other Caffeinated Beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (7): 2848-2852.
- Le Gall, G., Colquhoun, I. J. & Defernez, M. (2004). Metabolite profiling using ¹H NMR spectroscopy for quality assessment of green tea, *Camellia sinensis* (L.). *J. Agric. Food Chem.*, 52 (4): 692-700.
- Leenheer, J. A. & Croue, J.-P. (2003). Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, 37 (1): 18A-26A.
- Lenoir, J. (1997). *Le nez du café*, J. Lenoir, 117 p.
- Liang, Y. & Xu, Y. (2001). Effect of pH on cream particle formation and solids extraction yield of black tea. *Food Chem.*, 74 (2): 155-160.
- Lide, D. R. (2006). *Handbook of chemistry and physics*. Taylor & Francis, CRC Press, 2600 p.
- Lu, Y., Guo, W.-F. & Yang, X.-Q. (2004). Fluoride Content in Tea and Its Relationship with Tea Quality. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (14): 4472-4476.
- Luczaj, W. & Skrzydlewska, E. (2005). Antioxidative properties of black tea. *Prev. Med.*, 40 (6): 910-918.
- Malvern Instruments The measurement of zeta potential using an autotitrator: Effect of conductivity. consultée le 30 octobre 2006. Application note, N° 379-01.
- Marcos, A., Fisher, A., Rea, G. & Hill, S. J. (1998). Preliminary study using trace element concentrations and a chemometrics approach to determine the geographical origin of tea. *J. Anal. At. Spectrom.*, 13 (6): 521-525.
- Mariage Frères (1992). *L'Art du Thé*, M. Frères, 103 p.
- Mariage Frères (2003). *L'art français du thé*, M. Frères, 104 p.
- Martell, A. E. & Smith, R. M. (1977). *Critical stability constantes. Volume 3: Other organic ligands*, Plenum Press, New York, 495 p.
- Martell, A. E. & Smith, R. M. (1989). *Critical stability constantes. Volume 6: Second supplement*, Plenum Press, New York, 644 p.
- Matsuura, H., Hokura, A. & Haraguchi, H. (2000). Multielement determination and speciation of major-to-trace elements in green tea leaves by ICP-AES and ICP-MS *Bunseki Kagaku*, 49 (6): 397-404.
- Matsuura, H., Hokura, A., Katsuki, F., Itoh, A. & Haraguchi, H. (2001). Multielement determination and speciation of major-to-trace elements in black tea leaves by ICP-AES and ICP-MS with the aid of size exclusion chromatography. *Anal. Sci.*, 17 (3): 391-398.
- Miller, N. J., Castelluccio, C., Tijburg, L. & Rice-Evans, C. (1996). The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelators? *FEBS Lett.*, 392 (1): 40-44.
- Montreau, F. R. (1972). Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la méthode Folin-Ciocalteu. *Connaissance de la vigne et du vin*, 6: 397-404.

- Moore, P. B., Day, J. P., Taylor, G. A., Ferrier, I. N., Fifield, L. K. & Edwardson, J. A. (2000). Absorption of aluminium-26 in Alzheimer's disease, measured using accelerator mass spectrometry. *Dementia geriatr. cogn. dis.*, 11 (2): 66-69.
- Moreau, F. (1964). *Alcaloïdes et plantes alcaloïfères*, Puf, 3e éd., Paris, 158 p.
- Morel, F. M. M. (1983). *Principles of aquatic chemistry*. John Wiley & Sons, New York, 446 p.
- Muthumani, T. & Kumar, R. S. S. (2006). Influence of fermentation time on the development of compounds responsible for quality in black tea. *Food Chem.*, 101 (1): 98-102.
- Nagata, T., Hayatsu, M. & Kosuge, N. (1992). Identification of aluminum forms in tea leaves by aluminum-27 NMR. *Phytochem.*, 31 (4): 1215-1218.
- Natarajan, C. P., Ramamani, S., Leelavathi, D. E., Shakunthala, R., Bhatia, D. S. & Subrahmanyam, V. (1962). The brewing of tea. *Food Science (Mysore)*, 11: 321-332.
- National Bureau of Statistics of China. (2006). China Statistical Year Book - 2006. from <http://www.stats.gov.cn/tjsj/ndsj/2006/indexeh.htm>.
- Navarro, R. E., Santacruz, H. & Inoue, M. (2005). Complexation of epigallocatechin gallate (a green tea extract, egcg) with Mn²⁺: nuclear spin relaxation by the paramagnetic ion. *J. Inorg. Biochem.*, 99 (2): 584-588.
- Nonaka, G., Kawahara, O. & Nishioka, I. (1983). Tannins and related compounds. XV. A new class of dimeric flavan-3-ol gallates, theasinensins A and B, and proanthocyanidin gallates from green tea leaf. (1). *Chem. Pharm. Bull.*, 31 (11): 3906-3914.
- O'Coinceanainn, M., Bonnely, S., Baderschneider, B. & Hynes, M. J. (2004). Reaction of iron(III) with theaflavin: complexation and oxidative products. *J. Inorg. Biochem.*, 98 (4): 657-663.
- O'Mahony, M. (1986). *Sensory Evaluation of Food : Statistical Methods and Procedure*, Dekker, New York, 510 p.
- Odegard, K. E. & Lund, W. (1997). Multi-element speciation of tea infusion using cation-exchange separation and size-exclusion chromatography in combination with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 12 (4): 403-408.
- Owen, L. M., Crews, H. M., Bishop, N. J. & Massey, R. C. (1994). Aluminium uptake from some foods by guinea pigs and the characterization of aluminium in in vivo intestinal digesta by SEC-ICP-MS. *Food Chem. Toxicol.*, 32 (8): 697-705.
- Ozdemir, Y. & Gucer, S. (1998). Speciation of manganese in tea leaves and tea infusions. *Food Chem.*, 61 (3): 313-317.
- Pangborn, R. M., Trabue, I. M. & Little, A. C. (1971). Analysis of coffee, tea, and artificially flavored drinks prepared from mineralized waters. *J. Food Sci.*, 36 (2): 355-362.
- Pascal, C. (2006). Etude des interactions des tannins du raisin et du vinc blanc avec les protéines riches en proline : Aspects moléculaires et colloïdaux. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Montpellier, 222 p.
- Penders, M., Scollard, D., Needham, D., Pelan, E. & Davies, A. (1998a). Some molecular and colloidal aspects of tea cream formation. *Food Hydrocoll.*, 12: 443-450.
- Penders, M. H. G. M., Jones, D. P., Needham, D. & Pelan, E. G. (1998b). Mechanistic study of equilibrium and kinetic behavior of tea cream formation. *Food Hydrocoll.*, 12 (1): 9-15.
- Penders, M. H. G. M., Jones, D. P., Needham, D., Pelan, E. G., Underwood, D. R., Scollard, D. J. P. & Davies, A. P. (1998c). Kinetics and thermodynamics of tea cream formation. A colloidal approach. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 110 (Trends in Colloid and Interface Science XII): 163-170.

- Pettigrew, J. (1997). *Le Thé : guide du connaisseur*, Soline, Courbevoie, 192 p.
- Powell, J. J., Greenfield, S. M., Parkes, H. G., Nicholson, J. K. & Thompson, R. P. (1993). Gastro-intestinal availability of aluminium from tea. *Food Chem. Toxicol.*, 31 (6): 449-454.
- Prasain, J. K., Wang, C.-C. & Barnes, S. (2004). Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free radic. biol. med.*, 31 (9): 1324-1350.
- Price, W. E. & Spiro, M. (1985). Kinetics and equilibria of tea infusion: rates of extraction of theaflavin, caffeine and theobromine from several whole teas and sieved fractions. *J. Sci. Food. Agric.*, 36 (12): 1309-1314.
- Priest, N. D., Talbot, R. J., Austin, J. G., Day, J. P., King, S. J., Fifield, K. & Cresswell, R. G. (1996). The bioavailability of ²⁶Al-labeled aluminum citrate and aluminum hydroxide in volunteers. *BioMetals*, 9 (3): 221-228.
- Roberts, E. A. H. (1962). Economic importance of flavonoid substances; tea fermentation in *The Chemistry of Flavonoid Compounds*. Ed. M. Co. T. A. Geissman, New York, 468-512 p.
- Roberts, E. A. H. (1963). Phenolic substances of manufactured tea. X. Creaming down of tea liquors. *J. Sci. Food. Agric.*, 14 (10): 700-705.
- Roberts, E. A. H. & Smith, R. F. (1963). Phenolic substances of manufactured tea. IX. Spectrophotometric evaluation of tea liquors. *J. Sci. Food. Agric.*, 14 (10): 689-700.
- Sarni-Manchado, P. & Cheynier, V. (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 398 p.
- Schuh, C. & Schierberle, P. (2006). Characterization of the key aroma compounds in the beverage prepared from Darjeeling black tea: Quantitative differences between tea leaves and infusion. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (3): 916-924.
- Selvendran, R. R. & Perera, B. P. M. (1971). Chemical composition of tea leaf cell-wall. *Chem. Ind.* (21): 577-578.
- Shimoda, M., Shigematsu, H., Shiratsuchi, H. & Osajima, Y. (1995). Comparison of the odor concentrates by SDE and Adsorptive column method from green tea infusion. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1616-1620.
- Sigg, L., Behra, P. & Stumm, W. (2000). *Chimie des milieux aquatiques : Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement*, Dunod, 3e éd., Paris, 567 p.
- Smith, R. M. & Martell, A. E. (2001). Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database 46. Version 6.0 and 7.0 by National Institute of Standards and Technology.
- Song, Y., Cheng, H.-L., Her, G.-R. & Wen, K.-C. (2000). Analysis of synthetic drugs in chinese medicine by high performance liquid chromatography/mass spectrometry with in-source collision induced dissociation. *J. Chin. Chem. Soc.*, 47 (3): 475-480.
- Spiro, M. & Jaganyi, D. (1993). What causes scum on tea? *Nature*, 364: 581.
- Spiro, M. & Jaganyi, D. (1994a). Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 10. The composition and structure of tea scum. *Food Chem.*, 49 (4): 351-357.
- Spiro, M. & Jaganyi, D. (1994b). Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 11. The kinetics of the formation of tea scum. *Food Chem.*, 49 (4): 359-365.
- Spiro, M. & Lam, P.-L. L. (1995). Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 12. Equilibrium and kinetic study of mineral ion extraction from black Assam Bukial and green Chun Mee teas. *Food Chem.*, 54 (4): 393-396.

Spiro, M. & Price, W. E. (1987a). Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 6. The effects of salts and of pH on the concentrations and partition constants of theaflavins and caffeine in Kapchorua Pekoe Fannings. *Food Chem.*, 24 (1): 51-61.

Spiro, M. & Price, W. E. (1987b). Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 7. The effects of salts and of pH on the rate of extraction of caffeine from Kapchorua Pekoe fannings. *Food Chem.*, 25 (1): 49-59.

Spiro, M., Price, W. E., Miller, W. M. & Arami, M. (1987). Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 8. The effects of salts and of pH on the rate of extraction of theaflavins from black tea leaf. *Food Chem.*, 25 (2): 117-126.

Spiro, M. & Siddique, S. (1981). Kinetics and equilibria of tea infusion: kinetics of extraction of theaflavins, thearubigins, and caffeine from Koonsong Broken Pekoe. *J. Sci. Food. Agric.*, 32 (11): 1135-1139.

Stipp, S. L. & Hochella, M. F., Jr. (1991). Structure and bonding environments at the calcite surface as observed with x-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and low energy electron diffraction (LEED). *Geochim. Cosmochim. Acta*, 55 (6): 1723-1736.

Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.-G., Muntau, H., Van Leeuwen, H. P. & Lobinski, R. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. *Pure Appl. Chem.*, 72 (8): 1453-1470.

Trevisanato, S. I. & Kim, Y. I. (2000). Tea and health. *Nutr. Rev.*, 58 (1): 1-10.

United States Department of Agriculture. (2007). "National Plant Data Center." Retrieved 28/08/2007, from <http://plants.usda.gov/>.

Vdovic, N. (2001). Electrokinetic behaviour of calcite - the relationship with other calcite properties. *Chem. Geol.*, 177 (3-4): 241-248.

Vdovic, N. & Biscan, J. (1998). Electrokinetics of natural and synthetic calcite suspensions. *Colloids Surf. A.*, 137 (1-3): 7-14.

Vincken, J.-P., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J. & Visser, R. G. F. (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.*, 132 (4): 1781-1789.

Willats, W. G. T., Knox, J. P. & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci. Technol.*, 17 (3): 97-104.

Wills, M. R. & Savory, J. (1983). Aluminium poisoning: dialysis encephalopathy, osteomalacia, and anaemia. *Lancet*, 2 (8340): 29-34.

Wisniewski, H. M. & Wen, G. Y. (1992). Aluminium and Alzheimer's disease. *Ciba Found.*, 169: 142-164.

Xie, M., Von Bohlen, A., Klockenkaemper, R., Jian, X. & Guenther, K. (1998). Multielement analysis of Chinese tea (*Camellia sinensis*) by total-reflection X-ray fluorescence. *Z. Lebensm.-Unters. -Forsch., A Eur. food res. technol.*, 207 (1): 31-38.

Yaman, M. & Kaya, G. (2005). Speciation of iron(II) and (III) by using solvent extraction and flame atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 540 (1): 77-81.

Yamanishi, T. & Kobayashi, A. (1999). Progress of tea aroma chemistry in *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*. Ed. R. Teranishi, E. L. Wick and I. Horstein. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 135-145 p.

Zeeb, D. J., Nelson, B. C., Albert, K. & Dalluge, J. J. (2000). Separation and Identification of Twelve Catechins in Tea Using Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 72 (20): 5020-5026.

Zhou, C. Y., Wu, J., Chi, H., Wong, M. K., Koch, L. L. & Wee, Y. C. (1996). The behaviour of leached aluminium in tea infusions. *Sci. Total Environ.*, 177 (1): 9-16.

Zhu, Q. Y., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y. & Chen, Z.-Y. (1997). Stability of Green Tea Catechins. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (12): 4624-4628.

Zhu, X., Chen, B., Ma, M., Luo, X., Zhang, F., Yao, S., Wan, Z., Yang, D. & Hang, H. (2004). Simultaneous analysis of theanine, chlorogenic acid, purine alkaloids and catechins in tea samples with the help of multi-dimension information of on-line high performance liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34 (3): 695-704.

Zuo, Y., Chen, H. & Deng, Y. (2002). Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 57 (2): 307-316.

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Répartition des plantations de thé dans le monde (Mariage Frères, 1992)	6
Figure 1.2 : Répartition de la production mondiale en 2005 (FAO, 2007)	7
Figure 1.3 : Classification des feuilles de thé (Mariage Frères, 2003)	9
Figure 1.4 : Principales étapes du traitement des feuilles de théier après récolte.....	10
Figure 1.5 : Grades des thés orthodoxes	12
Figure 1.6 : Représentation schématique de la structure d'une macromolécule pectique : a) selon la représentation conventionnelle et b) selon le nouveau modèle proposé par (Vincken <i>et al.</i> , 2003) d'après (Willats <i>et al.</i> , 2006)	14
Figure 1.7 : Structure de la flavone (Goodwin, 1965).....	16
Figure 1.8 : Première étape de l'oxydation des flavan-3-ols par la polyphénoloxydase et exemple dans le cas de l'EGC (Haslam, 2003).....	18
Figure 1.9 : Mécanisme de passage de l'orthoquinone aux théaflavines (Haslam, 2003).....	19
Figure 1.10 : Les théaflavines (Del Rio <i>et al.</i> , 2004)	19
Figure 1.11 : Passage des orthoquinones aux théasinensines (Haslam, 2003)	20
Figure 1.12 : Groupements chromophores susceptibles de se former au sein des théarubigines (R = cycles A ou C de EGC ou ECGC). Les groupements -OH* représentent les sites ionisables des groupements chromophores conférant des propriétés d'acides faibles aux théarubigines (Haslam, 2003)	21
Figure 1.13 : Structure de la caféine, la théobromine (Del Rio <i>et al.</i> , 2004) et la théophylline (Zhu <i>et al.</i> , 2004)	21
Figure 1.14 : Mécanisme de fragmentation : a) la caféine (Atoui <i>et al.</i> , 2005), b) les catéchines (Zeeb <i>et al.</i> , 2000)	24
Figure 1.15 : Évolution de la concentration en caféine, théflavines et théarubigines dans les liqueurs de thé d'après le modèle cinétique développé par Spiro et Siddique (1981).....	27
Figure 1.16 : Formation d'écume de thé à la surface d'une liqueur de thé noir contenant du calcium et des hydrogénocarbonates (ce travail) (photographie comparable aux travaux de Spiro et Jaganyi (1994))	29
Figure 1.17 : Modèle d'interaction théaflavine-caféine avec $K_a = 11,9 \text{ L mol}^{-1}$ et $K_b = 16,5 \text{ L mol}^{-1}$ constantes d'association entre la caféine et la théaflavine (Charlton <i>et al.</i> , 1999) (Notation et Abréviations)	30
Figure 1.18 : Comportement des phases lors de la formation de crème de thé (température en fonction du rapport masse de feuilles sur masse d'eau (c/wt %)) : a) Liqueur classique ; b) Liqueur décaféinée (Penders <i>et al.</i> , 1998c).....	31
Figure 1.19 : Structure du complexe Fe(III)-théaflavine (O'Coinceanainn <i>et al.</i> , 2004).....	38
Figure 1.20 : Schéma de coordination possible entre Mn et a) EC ou b) ECGC avec r_B et r_D distances interatomiques entre l'ion Mn^{2+} et le proton du cycle le plus proche de l'ion (Navarro <i>et al.</i> , 2005)	39
Figure 1.21 : Pots et bols réglementaires pour la préparation d'une liqueur de thé : Pot pendant et après infusion.....	42
Figure 2.1 : Feuilles de thé avant infusion : a) thé noir broyé LS, b) thé noir M6 en feuilles entières et c) thé vert M2 en feuilles entières.....	47
Figure 2.2 : Protocole opératoire pour réaliser l'ultrafiltration des liqueurs	51
Figure 2.3 : Feuilles de thé M2 scannées pour la mesure de leur taille	53
Figure 2.4 : Définition de D_{\max} et D_{\min} dans le cas d'une feuille de thé pour le calcul du rapport de Feret	53
Figure 2.5 : Isotherme d'adsorption généralisée d'eau à l'équilibre, masse d'eau adsorbée vs. activité de l'eau, a_w , pour des matières végétales (Fenema, 1996). Zone I : eau fortement liée aux groupes ioniques ou polaires accessibles. Zone de transition entre les zones I et II : eau adsorbée formant une monocouche sur les groupements fortement polaires accessibles ; ici, il s'agit de la monocouche BET, l'eau commençant à engendrer des changements physico-chimiques en s'associant par des liaisons hydrogène aux molécules d'eau de la monocouche, condensation possible de l'eau. Zone III : eau adsorbée libre, disponible comme solvant, son activité étant alors suffisante	55
Figure 2.6 : Analyse des anions par chromatographie : Gradient d'élution et chromatogramme obtenu pour la dilution par 50 de la solution-mère contenant les sept anions	59
Figure 2.7 : Set normalisé utilisé pour l'analyse sensorielle des liqueurs de thé	68
Figure 2.8 : Utilisation d'un set lors de l'analyse sensorielle des liqueurs de thé	69

Figure 3.1 : Images permettant d'estimer la taille des feuilles des thés : a) vert M2, b) noir LS ayant subi un broyage mécanique et c) vert M5 B ayant subi un broyage manuel	77
Figure 3.2 : Isothermes d'adsorption d'eau en fonction de son activité pour deux thés noirs avec des feuilles entières (M8) et des feuilles broyées mécaniquement (LS) et un thé vert avec des feuilles entières (M5). Les masses de thé sont 27,24 mg pour M8, 28,79 mg pour LS et 14,82 mg pour M5.	78
Figure 3.3 : Masse de la liqueur rapportée à la masse d'eau initialement pesée (%)	88
Figure 3.4 : Évolution de la concentration en calcium en fonction de la durée entre la réalisation de la liqueur et l'analyse.....	88
Figure 3.5 : Rendement d'extraction d'éléments minéraux présents dans les feuilles de thé infusées dans l'eau UP à 95 °C durant 3 min en fonction de l'origine des thés. Les lignes rouges représentent les catégories d'extraction définies au Chapitre 1 (cf. 1.3.3.1).....	92
Figure 3.6 : Image d'écume de thé obtenue par analyse par MEB (eau Vi et thé M8)	95
Figure 3.7 : Spectre EDS de l'écume de thé obtenu par analyse du point entouré en rouge sur la Figure 3.6 (eau Vi et thé M8)	96
Figure 3.8 : Concentrations en carbone organique dissous (g C L^{-1}) dans les liqueurs de thé après filtration (0,45 μm) en fonction de la composition chimique de l'eau et du thé utilisés.....	97
Figure 3.9 : Concentrations en carbone organique dissous extrait par gramme de feuilles initialement pesées pour réaliser les liqueurs (mg C g^{-1}).....	98
Figure 3.10 : Rendement d'extraction des éléments inorganiques : a) manganèse, b) fer, c) cuivre, et d) zinc en fonction des eaux et thés utilisés	99
Figure 3.11 : Rendement d'extraction des éléments inorganiques : a) magnésium, b) aluminium, et c) potassium en fonction des eaux et thés utilisés.....	100
Figure 3.12 : Rendement d'extraction du calcium pour les eaux UP et MR en fonction des différents thés	101
Figure 3.13 : Concentrations (mg Ca L^{-1}) en calcium dans les eaux témoins (matérialisées par les lignes rouges) et les différentes liqueurs de thé	102
Figure 3.14 : Variations du potentiel ζ du CaCO_3 en solution dans l'eau Mont-Roucoux comparées aux valeurs de la littérature	110
Figure 3.15 : Potentiel ζ des particules dans la liqueur réalisée avec l'eau UP et intensité du signal correspondant. Les points de plus grande taille représentent les liqueurs sans ajustement de pH	112
Figure 3.16 : Liqueur UPM8 avec présence d'un précipité au fond du bécher (pH ajusté à 1 par ajout d'acide nitrique)	112
Figure 3.17 : Variation du potentiel ζ en fonction du pH dans la liqueur MRM8 et dans cette même liqueur avec la force ionique fixée à 0,5 mol L^{-1} . Les points de plus grande taille représentent les liqueurs sans ajustement de pH.....	113
Figure 3.18 : Comparaison des potentiels ζ mesurés pour la calcite seule (MR + CaCO_3) le jour de la préparation (CaCO_3 blanc J), de la calcite seule le lendemain de sa préparation (CaCO_3 blanc J+1) et des liqueurs de thé M8 préparées le jour J puis analysées à J et J+1. Les points de plus grande taille représentent les liqueurs sans ajustement de pH	114
Figure 3.19 : Évolution du potentiel ζ en fonction de la teneur en CaCl_2 pour les duplicats. Les points de plus grande taille représentent les liqueurs sans ajustement de pH.....	114
Figure 3.20 : Variation du potentiel ζ des liqueurs ayant une force ionique élevée. Les points de plus grande taille représentent les liqueurs sans ajustement de pH.....	115
Figure 3.21 : Courbes de variation du potentiel ζ en fonction du pH caractéristiques des eaux non minéralisée (UP), contenant du calcium (CaCl_2 H), contenant un système calco-carbonique (Vi) et possédant une force ionique élevée mais en absence de calcium (NaNO_3). Les points de plus grande taille représentent les liqueurs sans ajustement de pH	116
Figure 3.22 : Évolution de l'apparence des liqueurs UPM8 et CaCl_2 400 M8 lors de l'augmentation du pH pour l'obtention des courbes représentées dans la Figure 3.21.....	117
Figure 3.23 : Variation du potentiel ζ en fonction de la concentration en calcium pour les liqueurs avec les eaux UP, MR, MR + CaCl_2 B, MR + CaCl_2 H, MR + CaSO_4 et MR + CaCl_2 400.....	118
Figure 3.24 : Variation du potentiel ζ en fonction de la teneur en calcium et comparaison avec les eaux Vi et CaCO_3	119
Figure 3.25 : Modification de la couleur des liqueurs de thé UPM8 après ajustement du pH à 12 et redescende à 5,4.....	120

Figure 3.26 : Déplacement chimique des pics de la caféine seule pour 300 et 600 mg L ⁻¹ dans les eaux UP, MR, MR + CaCl ₂ B, MR + CaCl ₂ H et Vi, pour les différents pH (référence δ_{TMS} = 0 ppm).....	121
Figure 3.27 : Variation du déplacement chimique du proton H-8 dans les différentes liqueurs. Les intensités ont toutes été normalisées.....	121
Figure 3.28 : Spectre RMN ¹ H des liqueurs ViM8 et UPM8 par <i>excitation sculpting</i>	122
Figure 4.1 : Échelle de notation	134
Figure 4.2 : Échelle de notation continue de 10 cm	135
Figure 4.3 : Profils sensoriels de 8 liqueurs de thés noirs Darjeeling (4 thés × 2 eaux). Descripteurs significativement discriminants : *** p < 0,0001, ** p < 0,01.....	139
Figure 4.4 : ACP normée sur les neuf descripteurs et les huit liqueurs sur les F1 et F2	141
Figure 4.5 : ACP normée sur les neuf descripteurs et les huit liqueurs sur les axes F1 et F3	142
Figure 4.6 : ACP normée sur les neuf descripteurs et les huit liqueurs sur les axes F2 et F4	142
Figure 4.7 : Profils sensoriels de 5 liqueurs du thé M8. Descripteurs significativement discriminants : *** p < 0,0001, ** p < 0,01.....	145
Figure 4.8 : Les cinq liqueurs de thé M8 présentées dans le bol de dégustation.....	145
Figure 4.9 : ACP normée sur les six descripteurs et les cinq liqueurs sur les axes F1 et F2.....	147
Figure 5.1 : Représentation de log ([Al] _T) en fonction du pH pour toutes les liqueurs étudiées.....	156
Figure 5.2 : Représentation de log([Fe] _T) en fonction du pH pour toutes les liqueurs étudiées.....	156
Figure 5.3 : Spéciation de l'aluminium dans les liqueurs en fonction du pH (logiciel Minteq [®]). Les compositions prises en compte sont celle de MRM8 pour les traits pleins et celle de ViM8 pour les pointillées. Chaque trait rouge vertical matérialise le pH de la liqueur MRM8 (5,4) ou de celle ViM8 (7,6).....	158
Figure 5.4 : Comparaison des spectres RMN de la liqueur ViM8 obtenus soit directement en <i>excitation sculpting</i> , soit après lyophilisation et reprise de la phase solide dans D ₂ O.....	160
Figure 5.5 : 1) Bilan des réactions durant l'extraction de feuilles de thé dans une eau calco-carbonique ou non et 2) leurs conséquences sur les propriétés organoleptiques.....	162

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Cycle naturel du théier (Delmas & Minet, 2007)	8
Tableau 1.2 : Les principales sous-classes de la famille des flavonoïdes (Goodwin, 1965)	16
Tableau 1.3 : Nom usuel, abréviation, formule et pK_a des principales catéchines du thé ^(a)	17
Tableau 1.4 : Principaux fragments en mode ESI positif	23
Tableau 1.5 : Concentration totale en éléments minéraux des feuilles de thés verts (TV), thés noirs (TN) et thés <i>Oolong</i> (TO)	24
Tableau 1.6 : Influence du pH et de la teneur en sels de l'eau sur l'extraction de la caféine et de la théaflavine (Spiro & Price, 1987a; 1987b)	28
Tableau 1.7 : Résumé des paramètres influençant la formation de crème de thé	32
Tableau 1.8 : Composition minérale des liqueurs de thé	34
Tableau 1.9 : Étude de la spéciation ou du fractionnement de l'aluminium dans les liqueurs de thé (Flaten, 2002)	36
Tableau 1.10 : Analyse de fractionnement de l'aluminium par passage de liqueurs de thé sur une résine Chelex 100 (Alberti <i>et al.</i> , 2003)	36
Tableau 1.11 : Valeurs des pK_a des catéchines seules dans l'eau, stœchiométrie (N) des complexes Fe(III)(ligands) _n et leurs constantes de complexation (Jovanovic <i>et al.</i> , 1998; Kumamoto <i>et al.</i> , 2001)	38
Tableau 1.12 : Spéciation du manganèse au sein des feuilles et des liqueurs de thé (Ozdemir & Gucer, 1998) ..	39
Tableau 1.13 : Résumé du fractionnement des éléments minéraux dans les liqueurs de thé	40
Tableau 1.14 : Dureté des eaux dans les pays consommateurs de thé (GEMS, 2007)	44
Tableau 2.1 : Thés utilisés	47
Tableau 2.2 : Eaux utilisées : des eaux naturelles ou eaux « synthétiques »	48
Tableau 2.3 : Réactifs utilisés	49
Tableau 2.4 : Rapports entre les masses de feuilles et d'eau utilisées pour réaliser les liqueurs	50
Tableau 2.5 : Longueurs d'onde et paramètres expérimentaux utilisés pour les analyses élémentaires par ICP-AES	58
Tableau 2.6 : Paramètres utilisés lors des analyses par HPLC-UV-MS	61
Tableau 2.7 : Pics de masse correspondants acquis en mode SIM et temps de rétention moyens pour les composés lors des acquisitions	62
Tableau 2.8 : Limite de détection et de quantification en chambre cyclonique en quartz	63
Tableau 2.9 : Limite de détection et de quantification pour les minéralisats	63
Tableau 2.10 : Limite de détection et de quantification pour les analyses organiques	63
Tableau 2.11 : Limites de détection (LD) et de quantification (LQ), et erreur relative (% massique) pour l'analyse élémentaire	64
Tableau 2.12 : Paramètres des acquisitions en RMN (expériences en <i>excitation sculpting</i> et en zg)	65
Tableau 3.1 : Humidité relative (%) des feuilles de thé	75
Tableau 3.2 : Taille (μm) des différentes feuilles de thé mesurée par analyse d'image	76
Tableau 3.3 : Surfaces spécifiques (m ² g ⁻¹) des feuilles de thé (méthode BET, N ₂ 77 K)	78
Tableau 3.4 : Composition des feuilles de thés en éléments minéraux (mg g ⁻¹ de matière sèche)	80
Tableau 3.5 : Comparaison entre les intervalles de concentrations des éléments inorganiques analysés dans les feuilles de thé (Xie <i>et al.</i> , 1998) et ceux obtenus dans le présent travail	81
Tableau 3.6 : Compositions élémentaires organique et inorganique des feuilles de thé M8	82
Tableau 3.7 : pH, conductivité, composition anionique et cationique (mg L ⁻¹) des eaux non chauffées et chauffées	84
Tableau 3.8 : pH, conductivité et composition anionique (mg L ⁻¹) des eaux synthétiques chauffées	86
Tableau 3.9 : Variation de la masse des feuilles juste après l'infusion et après leur séchage suite à l'infusion ...	87
Tableau 3.10 : Moyenne des concentrations dans les quatre liqueurs de thé M5 réalisées durant trois semaines consécutives et analysées après filtration et minéralisation	89
Tableau 3.11 : Résultats de concentrations dans six liqueurs analysées trois fois chacune	89
Tableau 3.12 : Concentration (mg L ⁻¹) dans les liqueurs de thés verts réalisées à 70 et 95 °C	90

Tableau 3.13 : Constantes de protonation des acides ascorbique et citrique.....	91
Tableau 3.14 : Domaine de concentrations d'éléments minéraux contenus dans les liqueurs après leur minéralisation acide.....	92
Tableau 3.15 : pH des liqueurs de thé réalisées avec des différentes eaux.....	93
Tableau 3.16 : Effet du chauffage sur l'alcalinité calculée (mmol L^{-1}) des eaux utilisées pour préparer les liqueurs de thé	94
Tableau 3.17 : Diminution (%) de l'extraction de COD par gramme de feuilles par rapport à l'eau UP pour les différentes eaux et les différents thés.....	98
Tableau 3.18 : Bilan massique du calcium dans les feuilles et les liqueurs de thé M8, avant et après infusion..	102
Tableau 3.19 : Évolution du pH et de la conductivité des eaux synthétiques chauffées et des liqueurs de thé M8 correspondantes	103
Tableau 3.20 : Concentrations en COD (mg C L^{-1}) et polyphénols totaux (mg éq AG L^{-1}) exprimées aussi en mol C L^{-1} . Rapport et différence entre les deux grandeurs en mol C L^{-1}	105
Tableau 3.21 : Quantification des catéchines et des polyphénols par HPLC-UV-MS après filtration à $0,45 \mu\text{m}$ et par RMN dans les liqueurs de thé M8	106
Tableau 3.22 : Durée de filtration d'un volume de 40 mL des différentes liqueurs de thé M8 en fonction du seuil de coupure	107
Tableau 3.23 : Concentrations en polyphénols totaux, catéchines et alcaloïdes au sein des fractions ultrafiltrées des liqueurs de thé M8 en fonction de l'eau utilisée.....	108
Tableau 3.24 : Rendements d'extraction avec ou sans HF pour les eaux UP et Vi avec le thé M8	109
Tableau 3.25 : Concentrations (mg L^{-1}) des éléments inorganiques dans les liqueurs de thé M8 après minéralisation et analyse par ICP-AES	109
Tableau 3.26 : Variations des déplacements chimiques des protons de la caféine entre la caféine seule en solution et la caféine dans les liqueurs du thé M8 avec les eaux UP et Vi.....	122
Tableau 4.1 : Définition des descripteurs de l'analyse sensorielle du thé	126
Tableau 4.2 : Résultats du traitement statistique par ANOVA et ACP	127
Tableau 4.3 : Matrice de corrélation de l'ACP	128
Tableau 4.4 : Descripteurs retenus pour l'analyse sensorielle des liqueurs de quatre thés noirs.....	129
Tableau 4.5 : Produits de référence proposés pour les différents descripteurs.....	130
Tableau 4.6 : Mesures au spectrophotomètre UV-visible CM-508i des solutions de référence et des liqueurs MRM8 et ViM8.....	130
Tableau 4.7 : Concentrations (g L^{-1}) en sulfate d'aluminium, acide tannique, acide citrique et acide tartrique utilisées pour les tests de classement sur l'astringence et l'acidité.....	131
Tableau 4.8 : Performances individuelles lors du classement de solutions astringentes	132
Tableau 4.9 : Performances individuelles lors du classement de solutions acides	132
Tableau 4.10 : Regroupement des solutions astringentes après le test de Friedman	133
Tableau 4.11 : Récapitulatif des moyennes, des notes maximales et minimales pour chaque concentration pour les deux séances.....	134
Tableau 4.12 : Étude de la performance du panel par une ANOVA à deux facteurs avec interactions lors de l'entraînement.....	135
Tableau 4.13 : Étude des performances du panel par ANOVA.....	137
Tableau 4.14 : Résultats du test de comparaison multiple Newman Keuls.....	137
Tableau 4.15 : Moyenne des réponses obtenues pour chaque descripteur et chaque échantillon par l'ensemble des juges	140
Tableau 4.16 : Moyenne des notes obtenues pour chaque descripteur et chaque produit pour l'ensemble du panel	144
Tableau 4.17 : Étude de la performance du panel lors de l'analyse des cinq liqueurs de thé M8	146
Tableau 4.18 : Regroupement des produits pour chaque descripteur après le test de Newman Keuls.....	146
Tableau 5.1 : Matrice de corrélation globale des données physico-chimiques et sensorielles	152
Tableau 5.2 : Constantes de protonation et de complexation de l'aluminium avec les acides ascorbique et citrique	155

Annexe

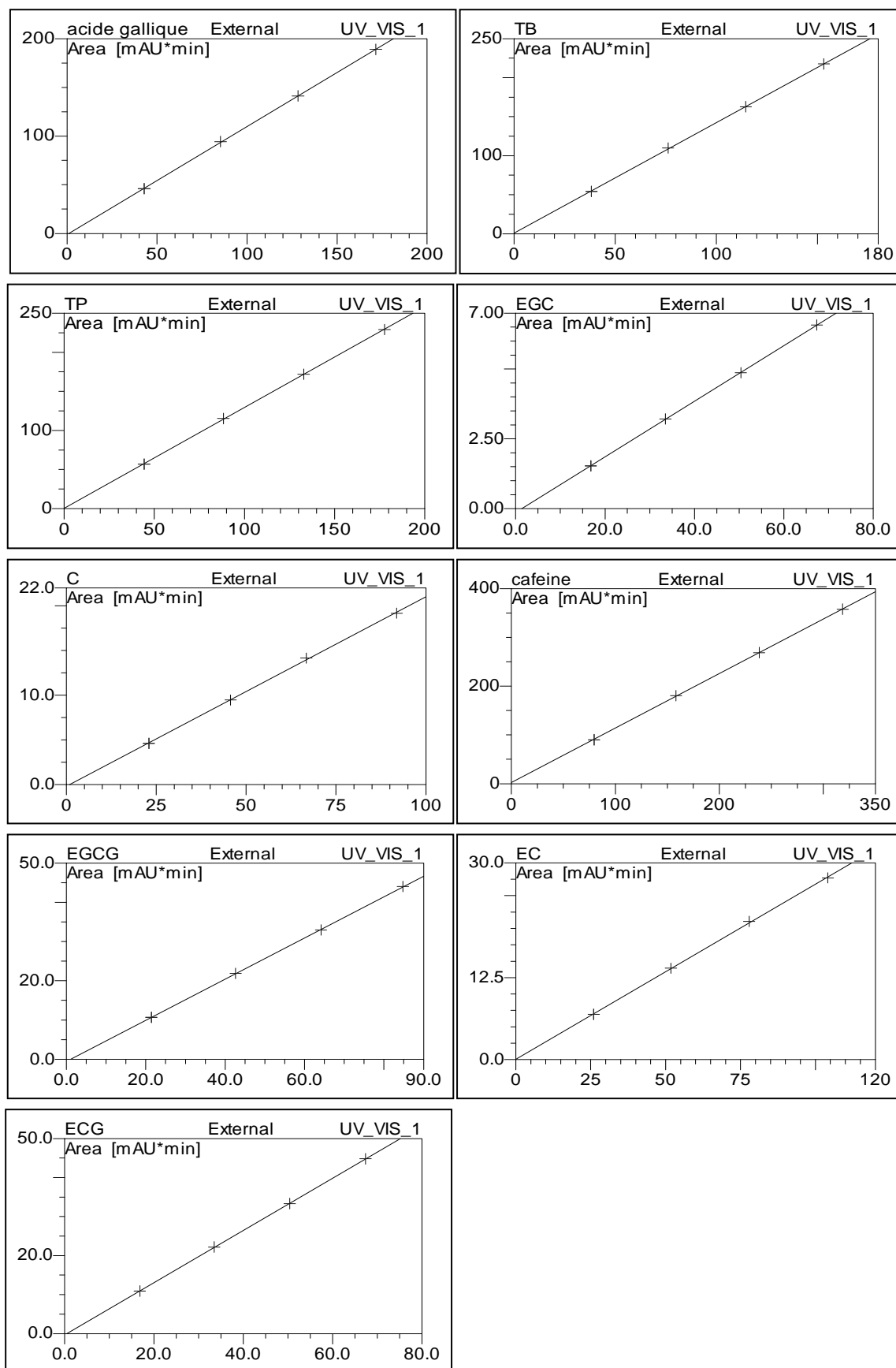
Annexe 1 : pKa de l'EDTA (LH ₄)	181
Annexe 2 : Droite d'étalonnage des composés en HPLC-UV-MS	182
Annexe 3 : Courbes d'étalonnage pour les analyses ICP-AES	183
Annexe 4 : Conductivité molaire équivalente (10^{-4} m ² S mol ⁻¹) des ions majeurs (Lide, 2006)	184
Annexe 5 : Espace de couleur L*a*b*	185
Annexe 6 : Constantes de complexation des hydroxydes d'aluminium et de fer (Sigg <i>et al.</i> , 2000)	187
Annexe 7 : Constantes de complexation utilisées pour le calcul Minteq	188
Annexe 8 : Publication et participations aux congrès	189

ANNEXE**Annexe 1 : pKa de l'EDTA (LH₄)**

Équilibre	pKa
L^{4-} / LH^{3-}	11,12
LH^{3-} / LH_2^{2-}	6,68
LH_2^{2-} / LH_3^{-}	3,24
LH_3^{-} / LH_4^{+}	2,72
LH_4^{+} / LH_5^{+}	1,0

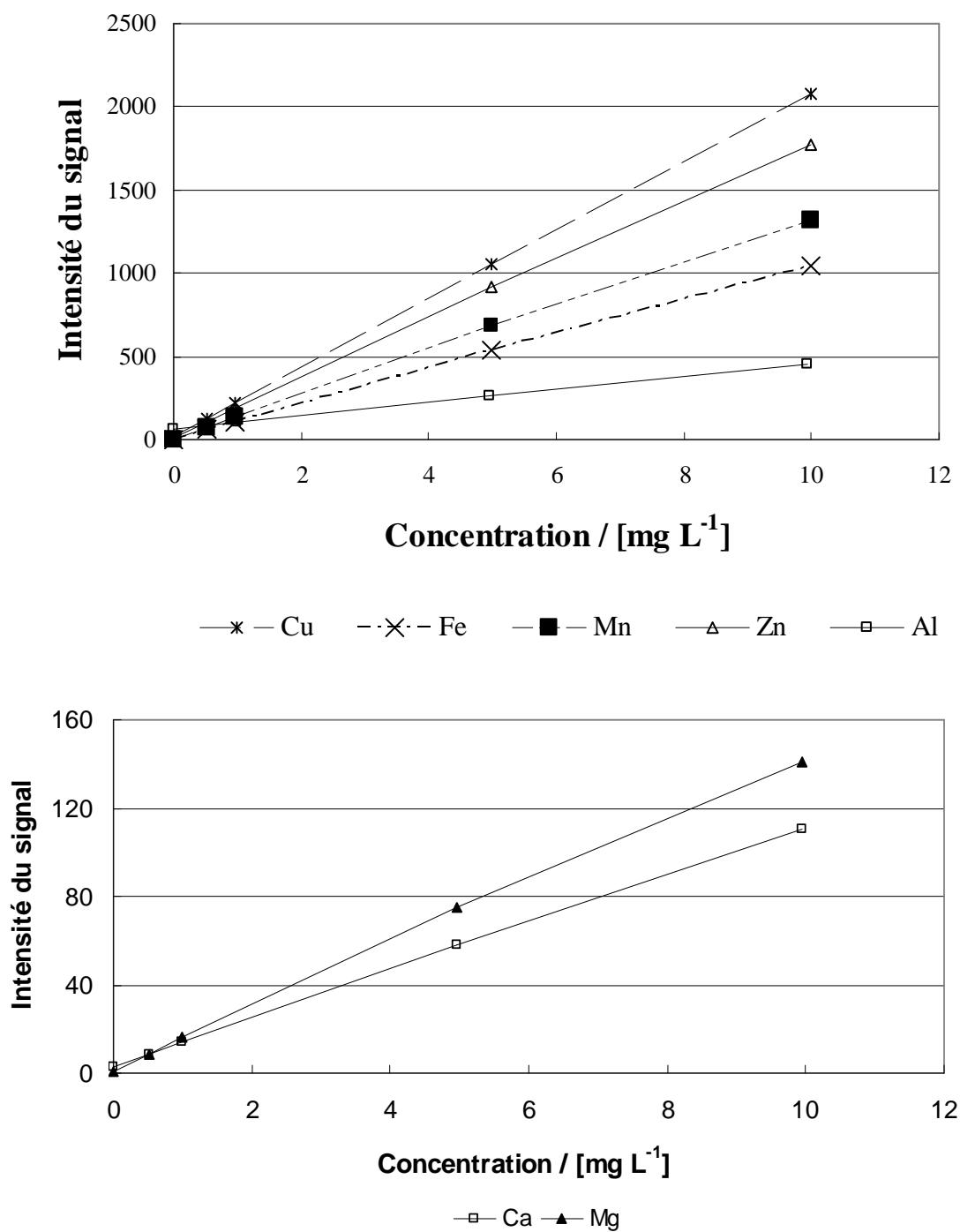
Les constantes sont corrigées pour la force ionique I = 0.

Annexe 2 : Droite d'étalonnage des composés en HPLC-UV-MS



Les abscisses représentent la concentration des différents composés en mg L⁻¹.

Annexe 3 : Courbes d'étalonnage pour les analyses ICP-AES



Annexe 4 : Conductivité molaire équivalente ($10^{-4} \text{ m}^2 \text{ S mol}^{-1}$) des ions majeurs (Lide, 2006)

Anions	Conductivité molaire équivalente ($10^{-4} \text{ m}^2 \text{ S mol}^{-1}$)	Cations	Conductivité molaire équivalente ($10^{-4} \text{ m}^2 \text{ S mol}^{-1}$)
Cl^-	76,31	Ca^{2+}	178,41
F^-	55,4	H^+	349,65
PO_4^{3-}	278,4	K^+	73,48
SO_4^{2-}	160	Mg^{2+}	53,0
		Mn^{2+}	53,5
		Na^+	50,08

Annexe 5 : Espace de couleur L*a*b*

La colorimétrie permet de caractériser une couleur par des valeurs numériques, conformes aux normes internationales, et d'exprimer ainsi avec plus de facilité et de précision cette dernière. Différents espaces couleurs sont utilisés pour exprimer la coloration, L*a*b*, Yxy et L*C*h. L'espace couleur L*a*b* (le CIELAB) est un système adopté par la CIE (Commission Internationale d'éclairage) en 1976. Il est actuellement l'un des plus utilisés pour mesurer la couleur des objets dans pratiquement tous les domaines. Il a été mis au point pour réduire l'un des principaux problèmes de l'espace Yxy, à savoir que les distances égales sur le diagramme de chromaticité x, y ne représentent pas les différences égales de couleurs perçues.

Dans l'espace L*a*b* (Fig. 1), L* indique la clarté tandis que (a* et b*) sont les coordonnées de chromaticité, indiquant le sens des couleurs : +a* va vers le rouge, -a* vers le vert, +b* vers le jaune et -b* vers le bleu. La valeur de L* s'échelonne de 0, pour le noir, à +100, pour le blanc. Plus on s'éloigne du centre, plus la saturation augmente. Les coefficients L*a*b* sont obtenus à partir des valeurs tri stimulus XYZ d'après les équations suivantes :

$$L^* = 116 \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - 16$$

$$a^* = 500 \left(\left(\frac{X}{X_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} \right)$$

$$b^* = 200 \left(\left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_n} \right)^{1/3} \right)$$

Avec X_n, Y_n et Z_n les valeurs tri stimulus pour l'observateur standard d'un diffuseur par réflexion idéale et X, Y et Z celles de l'échantillon.

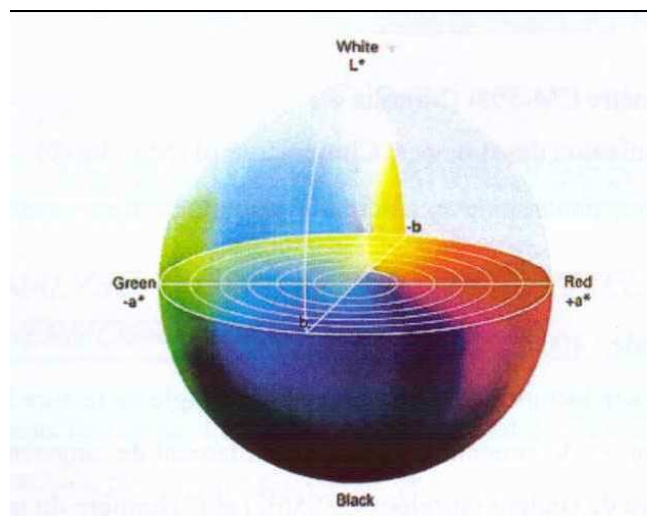


Fig. 1 : L'espace L*a*b*.

Les longueurs d'ondes sont comprises entre 400 et 700 nm. Le système d'éclairage/lecture est d/2 (éclairage diffuse/angle de lecture = 2). La source lumineuse est la lumière du jour moyenne sans la zone des ultraviolets avec une température de couleur corrélée de 6774K. Les mesures ont été effectuées en plaçant l'échantillon dans une capsule en plastique de 3 cm de diamètre.

Annexe 6 : Constantes de complexation des hydroxydes d'aluminium et de fer (Sigg *et al.*, 2000)

	Log K	
	Al	Fe
K_S	-33,9	-38,7
β_1	9,01	11,8
β_2	17,87	22,3
β_4	33,8	34,4

Avec $K_S = [Me^{3+}] [OH^-]^3$ et $\beta_i = \frac{[ML_i]}{[M][L]^i}$

Annexe 7 : Constantes de complexation utilisées pour le calcul Minteq

Ligands	Complexe	Log K	Référence
Catéchine LH ₂	AIL ₂ ⁺	-5,57	(Inoue <i>et al.</i> , 2002)
	AIL ₂ ⁻	-13,87	
	(AIL ₂ (OH)) ⁰	-11,33	
Épicatéchine LH ₂	AIL ₂ ⁺	-5,75	
	AIL ₂ ⁻	-13,95	
	(AIL ₂ (OH)) ⁰	-11,75	
Épigallocatechine LH ₂	AIL ₂ ⁺	-5,75	
	AIL ₂ ⁻	-12,91	
	(AIL ₂ (OH)) ⁰	-10,98	
Épigallocatechine gallate LH ₃	AIL ₃	-9,21	
	AILH ⁺	-4,47	
Fluorure	AlF ²⁺	7,01	(Smith & Martell, 2001)
	AlF ₂ ⁺	12,63	
	AlF _{3(aq)}	16,7	
	AlF ₄ ⁻	19,4	

Avec $K = \frac{[ML_i]}{[M][L]^i}$

Annexe 8 : Publication et participations aux congrès

Article avec comité de lecture

Mossion, A., Potin-Gautier, M., Delerue, S., Le Hécho, I. and Behra, P. (2008) Effect of water composition on aluminium, calcium and organic carbon extraction in tea infusions, *Food Chemistry*, 106 (4), 1467-1475.

Communications à des colloques internationaux

Mossion, A., Raynaud, C., Potin-Gautier, M. et Behra, P. (2007). Influence des paramètres physico-chimiques de l'eau sur les qualités organoleptiques du thé noir, GRUTTEE, 7ème Congrès International Suivi et Devenir des Contaminants dans l'Environnement : *Traitement, analyse, qualité et gestion durable*, Pau, 29-31 octobre, France, 2007, communication orale.

Mossion, A., Behra, P., Bueno, M. et Potin-Gautier, M. (2007). Du choix de votre eau sur la composition de votre tasse de thé, Spectr'atom 2007 - Convention sur la spectrométrie atomique, Pau, 21-24 mai, France, 2007, communication orale.

Mossion, A., Raynaud, C., Talou, T., Potin-Gautier, M. and Behra, P. (2007) Influence of water chemistry on black tea flavour, Euro Food Chem XIV - Société Française de Chimie, Paris, 29-31 août, France, affiche.

Mossion, A., Auger, M., Raynaud, C., Talou, T., Potin-Gautier, M. and Behra, P. (2006) Water impact on organoleptic characteristics and inorganic composition of black tea infusions, Food is life : 13th world congress of food science and technology - International Union of Food Science & Technology, Nantes, 17-21 septembre, France, affiche.

Mossion, A., Bueno, M., Behra, P. et Potin-Gautier, M. (2006) Water impact on tea infusion quality, Euro Food's Water : 4th international workshop on water in food - Institute for Reference Materials and Measurements, Bruxelles, 27-28 mars, Belgique, affiche.

Communications à des colloques nationaux

Mossion, A. (2006) Influence de l'eau sur la composition organique, minérale et les qualités organoleptiques des infusions de thé, Doctoriales de Midi-Pyrénées, Boussens, 14-20 mai, France, affiche.

Participation au colloque annuel du GDR : Assemblage des molécules végétales. (2006) Présentation des activités du laboratoire de Chimie Agro-Industrielle, Lille, 11-13 décembre, France, affiche.

Effect of water composition on aluminium, calcium and organic carbon extraction in tea infusions

Aurélien MOSSION^{1,2}, Martine POTIN-GAUTIER², Sébastien DELERUE^{1,2}, Isabelle Le HÉCHO² and Philippe BEHRA¹

¹ Université de Toulouse, UMR1010 Chimie Agro-Industrielle (LCA), ENSIACET, Institut National Polytechnique de Toulouse, INRA, 118 route de Narbonne - 31077 Toulouse Cedex 04 - France

Courriel : Philippe.Behra@ensiacet.fr

² Laboratoire de Chimie Analytique, Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE) - UMR 5254 IPREM Université de Pau et des Pays de l'Adour/CNRS - Avenue de l'Université - BP 576 - 64012 PAU Cedex - France

ABSTRACT

Tea infusion is the second world wide consumed beverage. In this study, total aluminium and calcium concentrations, total organic carbon and total polyphenol content were determined and compared with respect to the origin of tea leaves, their particle size (broken or whole leaves) but also the mineral composition of four waters. It appeared that the higher the mineral content, the lower the extraction yield of aluminium, total organic carbon and total polyphenols. This could be due to calcium uptake by leaves. Calcium present in mineral waters could be complexed with pectins present in cell walls thus leading to a decrease in the element extraction.

Keywords: tea infusion, water composition, extraction mechanism

1. Introduction

Since several years, tea consumption has been raised due to all scientific papers reporting that tea has benefit impact on human health due to its mineral and organic composition (Huang, Ho & Lee, 1992; Trevisanato & Kim, 2000; Zuo, Chen & Deng, 2002). Actually, tea infusions contain major inorganic elements and organic compounds among which calcium, magnesium, potassium, phosphate, fluoride, catechins and alkaloids.

Tea infusion composition depends on several parameters such as temperature (Khokhar & Magnusdottir, 2002), duration of brewing (Xie, Von Bohlen, Klockenkaemper, Jian & Guenther, 1998), leaf-water ratio (Astill, Birch, Dacombe, Humphrey & Martin, 2001), but also water composition. The latter one influences both extraction mechanisms from leaves and complexation phenomena taking place in infusions. Indeed, previous studies performed with water containing a high amount of calcium, 1.46 g L⁻¹, have showed that extraction rates of theaflavins and caffeine are decreased compared to ultra pure water (Spiro & Price, 1987a, 1987b; Spiro, Price, Miller & Arami, 1987c). Moreover, both calcium and magnesium appear to be the major elements (Chao & Chiang, 1999a, 1999b) involved in tea cream and scum

formation (Spiro & Jaganyi, 1993). Tea cream is a precipitate formed as tea cools down and is due to complexation between caffeine and theaflavins or thearubigins. This phenomenon is controlled by several parameters such as leaf-water ratio, pH and extraction temperature (Chao *et al.*, 1999a) and is favoured by calcium addition (Jöbstl, Fairclough, Davies & Williamson, 2005). Tea scum is defined as surface film composed of calcium, hydrogenocarbonates and organic matter. It appears only in infusions prepared with hard water and is produced by the oxidation of organic compounds induced to the presence of calcium carbonate (Spiro & Jaganyi, 1994a, 1994b). Calcium is of particular interest since tea leaves can uptake between 1 to 2.5 mg Ca g⁻¹ leaves brewed in water containing 10 to 150 mg Ca L⁻¹ (Anderson, Hollins & Bond, 1971). Anderson *et al.* (1971) have shown that the effect of this uptake on polyphenol and caffeine extraction is negligible, which is against Spiro and Price's results (1987a, 1987b).

On the other hand, *Camellia sinensis* (tea tree) is an aluminium accumulating plant (Stagg & Millin, 1975). Due to its strong affinity to organic matter, aluminium is highly extracted during brewing. Total aluminium contents in tea infusions range between 2 and 6 mg L⁻¹ depending on leaf origin and infusion parameters (Erdemoglu, Pyrzyniska & Gucer, 2000). Therefore, tea infusions could represent a primary source of aluminium daily uptake for consumers. Knowing that organically bound aluminium should be less toxic than free one (Driscoll, Baker, Bicogni & Schofield, 1980), many studies have focused on its fractionation and some others on its speciation according to the definitions given by IUPAC (Templeton *et al.*, 2000). Those works have shown that, in tea infusions, aluminium is mainly bound to organic matter, the nature of which is not exactly known (Flaten, 2002). For a minor part, aluminium could be bound to fluoride (Erdemoglu, Turkdemir & Gucer, 2000) or oxalate (Flaten, 2002).

The present work aims at investigating the influence of the mineral composition of water and of origin of tea leaves, particle size (broken or whole leaves) on total aluminium and calcium concentrations, total organic carbon (TOC) and total polyphenol contents (TPC) in tea infusions. Some elementary mechanisms such as complexation or diffusion were assumed in order to describe extraction mechanisms from tea leaves.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals, teas and waters

Ultra pure water prepared using a Milli-Q system (Model Gradient A10, Millipore) was used throughout the experiments. Nitric acid (68 %) and hydrogen peroxide (30 %) were analytical grade (VWR Prolabo). A single element 1.000 g L⁻¹ stock standard solution of aluminium (SCP Science) and a multi-element standard solution containing 100 mg L⁻¹ of calcium and also Sb, As, Be, Cd, Ca, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Mg, Mn, Mo, Ni, Se, Tl, Ti, V, Zn, Li, Sr (CPI-International) were used. Standards were prepared daily. Buffer solutions at pH 4.01 and 7.01 (Fisher Bioblock Scientific) were used to calibrate pH-meter. Anions were analysed after calibration with a seven anion standard solution containing 10 mg L⁻¹ of NO₂⁻ and Br⁻; 20 mg L⁻¹ of F⁻; 100 mg L⁻¹ of Cl⁻, SO₄²⁻ and NO₃⁻ (Dionex).

Teabags containing broken leaves were purchased in a supermarket for the Lipton Yellow[®] (LS) and Lipton Lemon[®] (LC). Bags were removed before brewing. Loose teas with whole leaves were purchased from a French tradesman: two Darjeeling teas from Oaks (M6) and Namring (M8) and two green teas from two different areas of China, one tea from Hu Bei

province (M2) and one from Guang Xi province (M5).

Five different waters (Table 1) were used to prepare infusions, the ultra pure water (A) and four mineral waters: two different weakly mineralised ones (B, C), and two highly mineralised ones (D, E). Water E was only used to test tea scum formation. Waters A, B and C were considered to be unbuffered with respect to pH contrary to waters D and E.

2.2. Preparation of tea infusions

Tea infusions were prepared according to the advices given by tradesmen as follows: 600 g of water at 95 °C was added to the indicated mass of leaves (Table 2) in a clean tea pot. After 3 min, the infusions were filtrated with a sieve (Nylon) for removing large particles and leaves. Glass flasks were used for organic matter analyses and polyethylene flasks for inorganic compound analyses. When necessary, infusions were filtrated through 0.45 µm cellulose acetate filters (Nalgene); those samples are named with “F” added after tea name. The so called blank water followed the same procedure without tea leaves.

Infusions were weighted after 20 min cooling to estimate infusion volume assuming that tea infusion density is 1 (after measurement $\rho = 0.999 \pm 0.001$ at 20 °C with either water A or D). Brewed leaves were oven-dried at 40 °C for 24 h before digestion and analysis.

For evaluating the impact of leaf size, M5 leaves were ground using a mortar and a pestle in agate before brewing. The infusion obtained was called M5 broken leaves.

2.3. Particle size measurements

Particle size distribution was evaluated using a scanner (Epson Perfection 3200 photo) and image analyse software Powdershape 4.3 (Innovative Sintering Technologies).

Measure mask parameters were the following ones:

- $100 \leq \text{diameter} \leq 100\,000\ \mu\text{m}$;
- $1 \leq \text{shape factor} \leq 10\,000$;
- $0 \leq \text{Feret ratio} \leq 1$;
- $0 \leq \text{convexity} \leq 1$.

The shape factor is the ratio between, the perimeter of the object and the perimeter of the surface equivalent circle. The Feret ratio is the ratio between the “maximum size”, *i.e.* the maximum distance between two parallel lines which squeezes the object and the “sieve size”, *i.e.* the minimum distance between two parallel lines which squeezes the object. Convexity is the ratio between the filled surface of the object and the surface of the convex enveloping object.

Tea leaves could be assimilated to fibres. Length is represented by maximum size and width is sieve size. Measurements were done in triplicates. For length and width, average, median and asymmetry coefficient were calculated.

2.4. Digestion procedure of tea infusions and leaves

10 g of tea infusion or 0.3 g of leaves were weighted in Teflon (PTFE) vessels. Three mL of HNO₃ and 2 mL of H₂O₂ were added. Vessels were introduced in pressure bombs, which were closed and put in a microwave oven. Samples were heated from 20 °C to 200 °C in 20 min. They were then kept at 200 °C for 15 min before cooling down to room temperature. This method has been optimised previously for plants at LCABIE (Pau). PTFE vessels were rinsed with ultra pure water and the resulting solutions were precisely adjusted to 35 g ultra

pure water.

Blanks were prepared following the same procedure but without leaf or infusion.

2.5. Total polyphenol measurements

Total polyphenol content was determined using Folin-Ciocalteu's method (Montreau, 1972). In a graduated flask, 0.5 mL tea extract, 5 mL Folin-Ciocalteu's reagent (Panreac) and 10 mL sodium carbonate (20 %, Panreac) were added and then adjusted to 100 mL with ultra pure water. The solutions were allowed to stand at 70 °C for 10 min before cooling down and absorbance measurement at 700 nm using a spectrophotometer. TPC was expressed in grams equivalent to the standard used (*i.e.* gallic acid, GA, Panreac) per litre of aqueous solution noted g eq GA L⁻¹. Analyses were performed in triplicate.

2.6. Instrumentation

Leaves were digested using a Multiwave 3000 (Anton Paar).

Anions in water were measured using a Dionex ICS-2000 system. Samples were passed through a AG18 guard and AS 18 analytical columns (Dionex) with a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The gradient employed was as follow: 0 – 1 min, 23 mM NaOH; 1 – 8 min, linear gradient 23 – 40 mM; 8 – 12 min, linear gradient 40 – 52 mM; 12 – 13 min, linear gradient 52 – 23 mM; 13 – 21 min, 23 mM. The injection volume was 25 µL. The supresseur current was set at 129 mA.

Aluminium and calcium concentrations were analysed using an ICP-AES (inductively coupled plasma-atomic emission spectrophotometry) instrument (Panorama, Jobin-Yvon). The following conditions established after optimisation of the instrument parameters are: Rf. power: 1000 W; plasma gas flow rate: 15 L min⁻¹; nebulizer gas flow rate: 0.1 L min⁻¹; nebulizer: cross-flow type; sample uptake: 1.0 mL min⁻¹.

Dissolved organic carbon (DOC) was measured using a TOC-5000A (Shimadzu) after filtration through 0.45 µm cellulose acetate filter (Nalgene) by difference between total carbon and inorganic carbon.

The spectrophotometer used for total polyphenol measurement was a 8452A (Hewlett Packard). pH measurements were carried out after cooling down of samples using a 330 pH-meter (WTW) with a combined Sentix 50 electrode (WTW).

Quantification limits (QL) were calculated from 10 blank measurements and according to the given equation (1) (IUPAC, 1987):

$$QL = \frac{10 \sigma}{k} \quad (1)$$

where k is the slope of the calibration curve and σ the standard deviation of the blank signal. QL values for Al, Ca, inorganic carbon, organic carbon and total polyphenol content were 0.2, 0.01, 0.5, 0.6 and 0.6 mg L⁻¹, respectively.

2.7. Extraction yield calculations

Tea infusion mass was lower than initial water mass due to loss of water by evaporation during heating (about 8 %) and by absorption by leaves, especially in the case of whole leaves (decrease in 7 % vs. 1 % for broken leaves). This variation in mass was taken into account for calculating extraction yield, R:

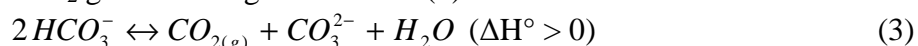
$$R = \frac{[x] \times V}{M} \times 100 \quad (2)$$

where $[x]$ is the experimental concentration in filtrated or digested infusions, V the infusion volume and M the theoretical mass, *i.e.* mass calculated considering the complete extraction of elements from leaves during brewing. Errors were estimated by adding relative errors of concentration measurements, volume and theoretical mass.

3. Results

3.1. pH

Values of pH of waters and tea infusions are reported in Table 3. pH rises for blank value after heating, except ultra pure water A. In this specific case, pH before and after heating is unstable and varies quickly between 5.7 and 6.5. Variations are mainly due to CO₂ dissolution and very low ion concentration in the water. For the other waters, the increase in pH after heating can be due to both the loss of the CO₂ gas dissolved in water and the loss of hydrogenocarbonate as CO₂ gas following the reaction (3):



pH values of tea infusions strongly depend on the buffer capacity of waters (Table 3). Black tea infusions made with broken or whole leaves have pH values lower than green tea infusions with non-buffered waters A, B and C. For LC infusions, with the presence of lemon, pH is even lower compared to LS infusions. The calcium-carbonated system present in waters D and E buffers pH values between 7.1 and 7.8 even for lemon tea infusion (Table 3). These results are consistent with those reported by Xie *et al.* (1998). These authors have suggested that this could be due to the degree of fermentation, *i.e.* oxidation, of organic compounds which leads to an increase in phenolic and carboxylic groups.

3.2. Particle sizes of teas

Particle sizes of tea leaves are reported in Table 4. Size distributions are asymmetric with positive skew for all tea leaf types so average values are above median ones except for M2 leaves. Whole leaves are 3 to 9 times longer than broken leaves LS and LC. Manually-ground M5 leaves are in average 10 times smaller than whole M5 leaves. Observations of M5B leaves showed that leaf cells, which have a fibrous aspect, were less damaged after manually grinding than LS and LC leaves.

3.3. Aluminium and calcium concentrations in tea leaves

Aluminium and calcium concentrations measured in the present study are reported and compared to literature data in Table 5. The concentrations are in the same order of magnitude but depend on the geographical origin (*i.e.* China or Darjeeling) of leaves and type (*i.e.* green or black) of tea. The concentrations of aluminium range from 0.4 to 1.0 mg g⁻¹, those of calcium from 3.3 to 5.0 mg g⁻¹.

3.4. Organic Carbon in tea infusions

3.4.1. Dissolved organic carbon (DOC)

Extracted organic matter ranges from 0.3 to 0.5 g L⁻¹ in broken tea leaves and from 1.0 g L⁻¹

to 2.3 g L^{-1} for whole leaves. Infusions prepared with water B have nearly the same composition as those prepared with water A. The presence of 1.4 mg L^{-1} of calcium does not have any effect. Decrease in organic matter extraction is significant for waters C and D. For comparing extractions, results were expressed as mass of DOC with respect to one gram of leaves (Fig. 1). In that case, organic carbon contents are similar for black (from 40 to 110 mg g^{-1}) and green teas (from 38 to 80 mg g^{-1}) with a slight increase for broken leaves compared to whole ones. The decrease due to water mineralisation is more significant for tea with broken leaves than with whole ones (Fig. 1). Finally, organic carbon extracted during brew up decreases when water mineralisation increases.

3.4.2. Total polyphenol content

Total polyphenol contents were measured in liquors brewed up with M8 and analysed without filtration. The values obtained are $1.20 \pm 0.02 \text{ g eq GA L}^{-1}$ (water A), $1.11 \pm 0.03 \text{ g eq GA L}^{-1}$ (water B), $1.00 \pm 0.06 \text{ g eq GA L}^{-1}$ (water C) and $0.70 \pm 0.06 \text{ g eq GA L}^{-1}$ (water D). Those values are consistent with the DOC ones which are $1.78 \pm 0.03 \text{ g C L}^{-1}$ (water A), $1.34 \pm 0.06 \text{ g C L}^{-1}$ (water B), $1.39 \pm 0.05 \text{ g C L}^{-1}$ (water C) and $1.25 \pm 0.02 \text{ mg C L}^{-1}$ (water D).

3.5. Aluminium concentrations in tea infusions

Aluminium concentrations in infusions range from 0.06 to 3.24 mg L^{-1} depending on water used (Table 6). For ultra pure water, values are below those reported in literature especially for whole leaves. But authors used different experimental conditions to prepare infusions: either a teabag containing 2 g of powdered leaves in 200 mL of water (Odegard & Lund, 1997) or 2 g of powered leaves in 100 mL of water (Matsuura, Hokura, Katsuki, Itoh & Haraguchi, 2001).

Extraction yields calculated according to relationship (2) were applied to aluminium (Fig. 2). In the present study, aluminium is poorly extractable using whole leaves ($5 \% < R < 11 \%$). Al extraction is more efficient with broken leaves ($20 \% < R < 40 \%$). Grinding of leaves increases extraction yield by a factor of 1.5 (Fig. 3) but those yields are still lower than those obtained with LS and LC broken leaves. Except for infusions prepared with LC leaves, for all the other teas aluminium extraction depends strongly on water mineralisation. The largest decrease is observed when increasing mineral content. For LC leaves, water mineralisation does not seem to influence extraction which could be due to the presence of citric acid.

3.6. Calcium concentrations in tea infusions

Fig. 4 represents calcium concentrations in the different tea infusions. For each water used, blank water calcium concentration is reported and has to be compared to infusion ones.

Calcium concentrations in infusions range from 0.65 ± 0.07 to $2.6 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$ with ultra pure water (Fig. 4a) and corresponds to extraction yields smaller than 5% (data not shown). These results are consistent with previous studies by Odegard *et al.* (1997) and Matsuura *et al.* (2001) who have reported values of $2.5 \pm 0.6 \text{ mg L}^{-1}$ and $4.03 \pm 0.02 \text{ L}^{-1}$, respectively. With water B (containing 1.4 mg Ca L^{-1}), calcium concentrations range from 2.38 ± 0.1 to $4.0 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ including calcium present in water. If calcium blank values are subtracted, extraction yields are equivalent to those obtained with ultra pure water. Grinding of leaves leads to an increase in extraction yield (Fig. 5) lower than the increase observed for aluminium (Fig. 3).

Heating water D leads to a decrease in the calcium content due to its precipitation as $\text{CaCO}_{3(s)}$ (Table 1). For waters C and D, calcium concentrations in infusions are lower than initial calcium water concentration in filtrated infusions (data not shown) as well as in digested ones (Fig. 4). Those decreases in calcium concentrations are more significant with the highest mineralised water D (from 10 to 70 mg L^{-1}) than with water C (from 3 to 10 mg L^{-1}) except for infusions prepared with broken leaves in water D. After calculating mass balance using 4 g of M8 leaves with 200 mL of water, it appears that, with water D, 1 mg of calcium is uptaken per g of brewed leaves (Table 7).

3.7. Tea scum formation

Scum was formed in the presence of waters D and E due to the presence of calcium, hydrogenocarbonate and organic matter. Before heating, water E has the same composition as the water used by Spiro and Jaganyi (1994a, 1994b) who have not reported if given values are considered before or after heating water. As shown in the previous paragraph, heating highly mineralised water leads to a decrease in calcium and hydrogenocarbonate contents. Finally, after heating, water E contains 64 mg Ca L^{-1} and 213.5 $\text{mg HCO}_3 \text{ L}^{-1}$, which represents decreases in 30 % and 35 % respectively. After heating, water D contains about 150 mg Ca L^{-1} and 156 $\text{mg HCO}_3 \text{ L}^{-1}$, which represents 50 % more calcium than in the study carried out by Spiro and Jaganyi (1994a, 1994b) but 50 % less hydrogenocarbonate.

4. Discussion

Particle size seems to play a role in chemical extraction. Indeed, broken leaves and manually-ground M5 leaves always have extraction yields higher than whole ones. But yield from manually-ground leaves are always lower than those of broken ones. The highest yield could be due to manufacture effect. In fact, whole leaves are manufactured following the orthodox process resulting in less cellular damages than the Crush Tear and Curl (CTC) process often used for teabag leaves (Goodsall, Hodges, Jones, Mawson & Stabler, 1999). So, CTC leaves brew faster than whole ones. This result is consistent with leaf pictures performed during size measurement showing a strong difference between shapes of leaves.

On the other hand, water composition plays an important role in chemical extraction from tea leaves. Concerning calcium behaviour, its uptake by tea leaves, around 1 mg g^{-1} leaves, is consistent with the work of Anderson *et al.* (1971). Moreover, extraction yields with ultra pure water are lower in the present study (water A) compared to Anderson *et al.* one (1971). This phenomenon could be due to differences in cell structure or leaf treatment, CTC vs. orthodox. Indeed, it seems that this uptake is not diffusion-controlled because it takes place with water C although its calcium content is lower than calcium content of leaves, contrary to water D.

In most of speciation studies, infusions are filtrated through 0.45 μm membranes prior to analyses what leads to separation of precipitate and large colloids containing calcium and organic carbon on the filters before analyses. This treatment could cause the decrease in DOC and calcium in infusions, mainly for infusions prepared with highly mineralised waters because of cream formation enhancement by calcium addition (Jöbstl *et al.*, 2005). The decrease in DOC would be however consistent with TPC measurements performed without any filtration confirming the role of water composition in organic matter extraction. But, TPC data, which corroborate Spiro and Price data (1987), are not consistent with Anderson *et al.*

ones (1971). The differences observed between Anderson *et al.* (1971) and the present work would be due to the analytical method used. Nowadays, Folin-Ciocalteu's method is considered as the most sensitive one for TPC analyses in tea compared to ferrous tartrate method, Lowenthal's method and α,α' -dipyridyl method (Yoshino, Sugiura, Shinohara & Hirota, 2004). In 1971, Folin-Ciocalteu's method did not exist yet so that Anderson *et al.* used the Lowenthal's method. Spiro *et al.* (1987a) have observed the decrease in caffeine and theaflavin extraction using a water with an ionic strength of 0.11 mol L^{-1} prepared by addition of CaCl_2 . Although, water D, used in the present work, has a lower ionic strength of 0.021 mol L^{-1} , decrease in organic matter extraction is confirmed. Moreover, we show that similar behaviour exists for inorganic compounds.

Some studies have reported on the cellular distribution of aluminium and calcium in tea leaves (Carr, Lombi, Kupper, McGrath & Wong, 2003). Aluminium as well as calcium preferentially accumulate in cell walls of epidermis of fresh young leaves that are generally used for high grade tea. On the other hand, calcium seems to be present in the spongy mesophyll tissue as crystals, their exact nature of which is not known. Those differences in compartmentation in tea leaf could explain why aluminium is more extractable than calcium.

Extraction mechanism of organic and inorganic compounds from tea leaves seems to follow two steps (Spiro *et al.*, 1987b): first, water is up taken by leaves; second, elements and molecules diffuse from tea leaves to the infusion. In the case of brewing tea in highly mineralised water, calcium uptake by leaves could take place during the first step and could be complexed by pectins present in cell wall as suggested by Spiro *et al.* (1987c). This complexation could modify cell wall properties. Indeed, calcium is well known to modulate gelification of pectins (Kawabata, Sawayama, Nakahara & Kamata, 1981; Capel, Nicolai, Durand, Boulenguer & Langendorff, 2006). Those modifications could then limit the extraction of organic but also inorganic compounds. It would be thus interesting to investigate where and how calcium is trapped. For aluminium, decrease in pH due to the presence of weak acids would increase its extraction from leaves due to competition between aluminium and proton for complex formation and presence of more soluble cation species of aluminium mainly for pH below 5 (Sigg *et al.*, 2006).

Compared to the earliest studies where scum has been obtained by keeping the infusions at 80°C for 60 min, scum formation is observed during the cooling process in the present work. A calcium content as low as 64 mg L^{-1} is sufficient to lead to scum formation and hydrogenocarbonate should not be in excess compare to calcium to observe it.

5. Conclusion

Analysis of aluminium, calcium and organic carbon in infusions prepared using broken black leaves as well as whole black and green leaves showed an effect of water mineralisation on their extraction. The higher the mineralisation, the lower the extraction yields of organic matter and aluminium. Calcium is uptaken from highly mineralised water and assumed to be complexed with pectins in cell walls thus explaining the decrease in extraction yield. Further work about calcium fixation sites in leaves is needed to corroborate the hypothesis.

Acknowledgements

This work is supported by a grant from *Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche* to A.M. and by Mariage Frères® (Paris, France).

Christian Coelho is thanked for carrying out TPC measurements, Dr. Maité Bueno and Dr. Fabienne Seby (Ultra-Traces Analyses Aquitaine) for their help in LCABIE. Prof. E. Jamet is acknowledged for helpful discussion and English improvement of the manuscript.

References

- Anderson, W., Hollins, J. G. & Bond, P. S. (1971). The composition of tea infusions examined in relation to the association between mortality and water hardness. *The Journal of Hygiene*, 69(1): 1-15.
- Astill, C., Birch, M. R., Dacombe, C., Humphrey, P. G. & Martin, P. T. (2001). Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(11): 5340-7.
- Capel, F., Nicolai, T., Durand, D., Boulenguer, P. & Langendorff, V. (2006). Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*, 20(6): 901-907.
- Carr, H. P., Lombi, E., Kupper, H., McGrath, S. P. & Wong, M. H. (2003). Accumulation and distribution of aluminium and other elements in tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Agronomie*, 23(8): 705-710.
- Chao, Y. C. & Chiang, B. H. (1999a). Cream formation in a semifermented tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(13): 1767-1774.
- Chao, Y. C. & Chiang, B. H. (1999b). The roles of catechins and caffeine in cream formation in a semi-fermented tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(12): 1687-1690.
- Driscoll, C. P., Baker, J. P., Bicogni, J. J. & Schofield, C. L. (1980). Effect of aluminium speciation on fish in dilute acidified waters. *Nature*, 284: 161.
- Erdemoglu, S. B., Pyrzyniska, K. & Gucer, S. (2000). Speciation of aluminum in tea infusion by ion-exchange resins and flame AAS detection. *Analytica Chimica Acta*, 411(1-2): 81-89.
- Erdemoglu, S. B., Turkdemir, H. & Gucer, S. (2000). Determination of total and fluoride bound aluminium in tea infusions by ion selective electrode and flame atomic absorption spectrometry. *Analytical Letters*, 33(8): 1513-1529.
- Flaten, T. P. (2002). Aluminium in tea. Concentrations, speciation and bioavailability. *Coordination Chemistry Reviews*, 228(2): 385-395.
- Goodsall, C. W., Hodges, R. C., Jones, T. G., Mawson, J. D. & Stabler, P. J. (1999). Tea manufacture. Application: WO, Unilever Plc, UK; Unilever N.V.; Hindustan Lever Limited.
- Huang, M. T., Ho, C.-T. & Lee, C. Y. (1992). Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health II: Antioxidants and Cancer Prevention. *American Chemical Society Symposium Series 507*. Washington DC, American Chemical Society. **507**: 8-34.
- IUPAC (1987). Recommendations for the definition, estimation, and use of the detection limit. *Analyst (Cambridge, United Kingdom)*, 112(2): 199-204.
- Jöbstl, E., Fairclough, J. P. A., Davies, A. P. & Williamson, M. P. (2005). Creaming in black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(20): 7997-8002.
- Kawabata, A., Sawayama, S., Nakahara, H. & Kamata, T. (1981). Studies on gelling mechanism of pectin. Part II. Mechanism of association of various demethylated pectins by calcium ions. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(4): 965-73.
- Khokhar, S. & Magnusdottir, S. G. M. (2002). Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *J. Agric. Food Chem.*, 50(3): 565-570.
- Matsuura, H., Hokura, A., Katsuki, F., Itoh, A. & Haraguchi, H. (2001). Multielement determination and speciation of major-to-trace elements in black tea leaves by ICP-AES and ICP-MS with the aid of size exclusion chromatography. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 17(3): 391-8.
- Montreau, F. R. (1972). Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la méthode Folin-Ciocalteu. *Connaissance de la vigne et du vin*, 6: 397-404.
- Odegard, K. E. & Lund, W. (1997). Multi-element speciation of tea infusion using cation-exchange separation and size-exclusion chromatography in combination with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12(4): 403-408.
- Spiro, M. & Jaganyi, D. (1993). What causes scum on tea? *Nature*, 364: 581.
- Spiro, M. & Jaganyi, D. (1994a). Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 10. The composition and

- structure of tea scum. *Food Chem.*, 49(4): 351-357.
- Spiro, M. & Jaganyi, D. (1994b). Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 11. The kinetics of the formation of tea scum. *Food Chem.*, 49(4): 359-365.
- Spiro, M. & Price, W. E. (1987a). Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 6. The effects of salts and of pH on the concentrations and partition constants of theaflavins and caffeine in Kapchorua Pekoe Fannings. *Food Chem.*, 24(1): 51-61.
- Spiro, M. & Price, W. E. (1987b). Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 7. The effects of salts and of pH on the rate of extraction of caffeine from Kapchorua Pekoe fannings. *Food Chem.*, 25(1): 49-59.
- Spiro, M., Price, W. E., Miller, W. M. & Arami, M. (1987c). Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 8. The effects of salts and of pH on the rate of extraction of theaflavins from black tea leaf. *Food Chem.*, 25(2): 117-126.
- Stagg, G. V. & Millin, D. J. (1975). Nutritional and therapeutic value of tea. Review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(10): 1439-1459.
- Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.-G., Muntau, H., Van Leeuwen, H. P. & Lobinski, R. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. *Pure and Applied Chemistry*, 72(8): 1453-1470.
- Trevisanato, S. I. & Kim, Y. I. (2000). Tea and health. *Nutrition reviews*, 58(1): 1-10.
- Xie, M., Von Bohlen, A., Klockenkaemper, R., Jian, X. & Guenther, K. (1998). Multielement analysis of Chinese tea (*Camellia sinensis*) by total-reflection X-ray fluorescence. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A: Food Research and Technology*, 207(1): 31-38.
- Yoshino, K., Sugiura, Y., Shinohara, C. & Hirota, M. (2004). Determination of antioxidant activities and quantitative analysis of various phenolic compounds. *Denki Kagakkai Gijutsu, Kyoiku Kenkyu Ronbunshi*, 11(2): 59-70.
- Zuo, Y., Chen, H. & Deng, Y. (2002). Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 57(2): 307-316.

Figure Captions

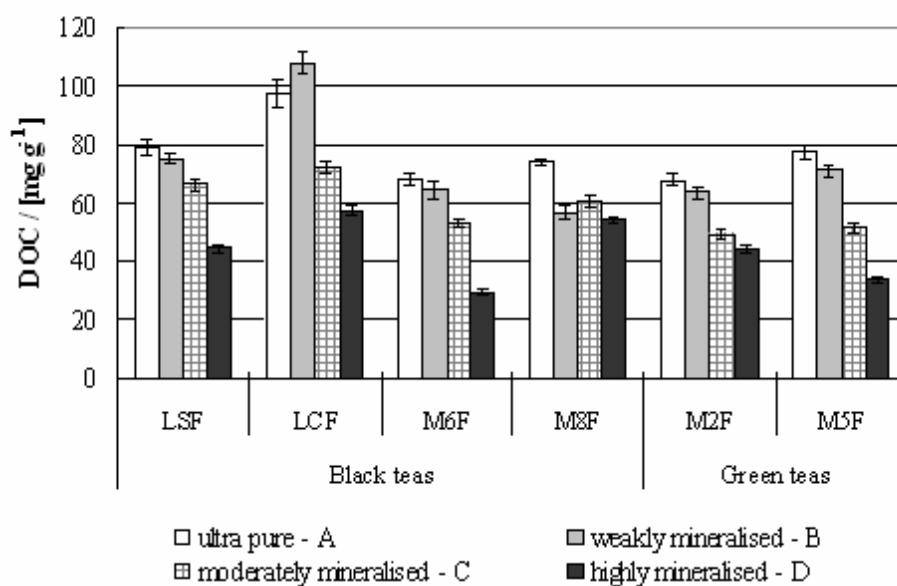


Fig. 1: Effect of water composition on dissolved organic carbon (DOC) content extracted from tea leaves per g of brewed leaves (mg C g⁻¹)

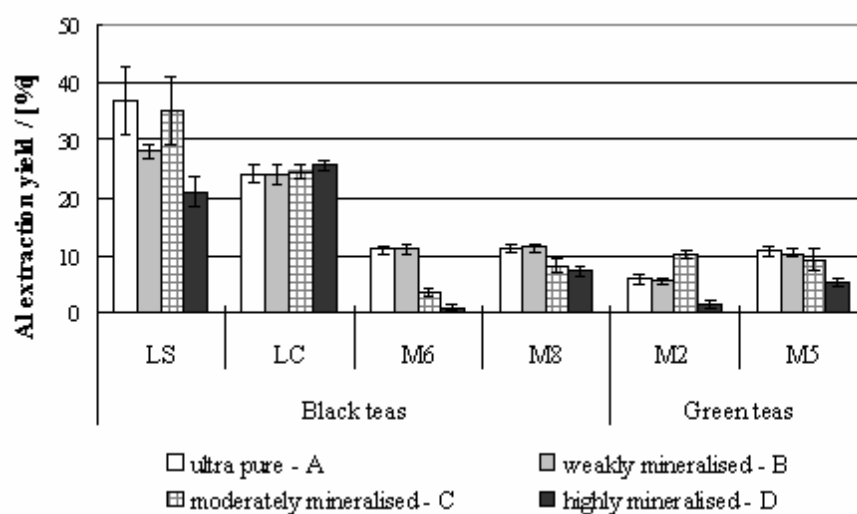


Fig. 2: Aluminium extraction yields in digested infusions

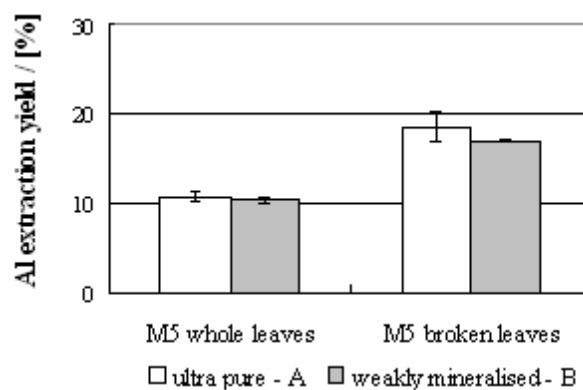


Fig. 3: Aluminium extraction yields with whole and broken M5 tea leaves

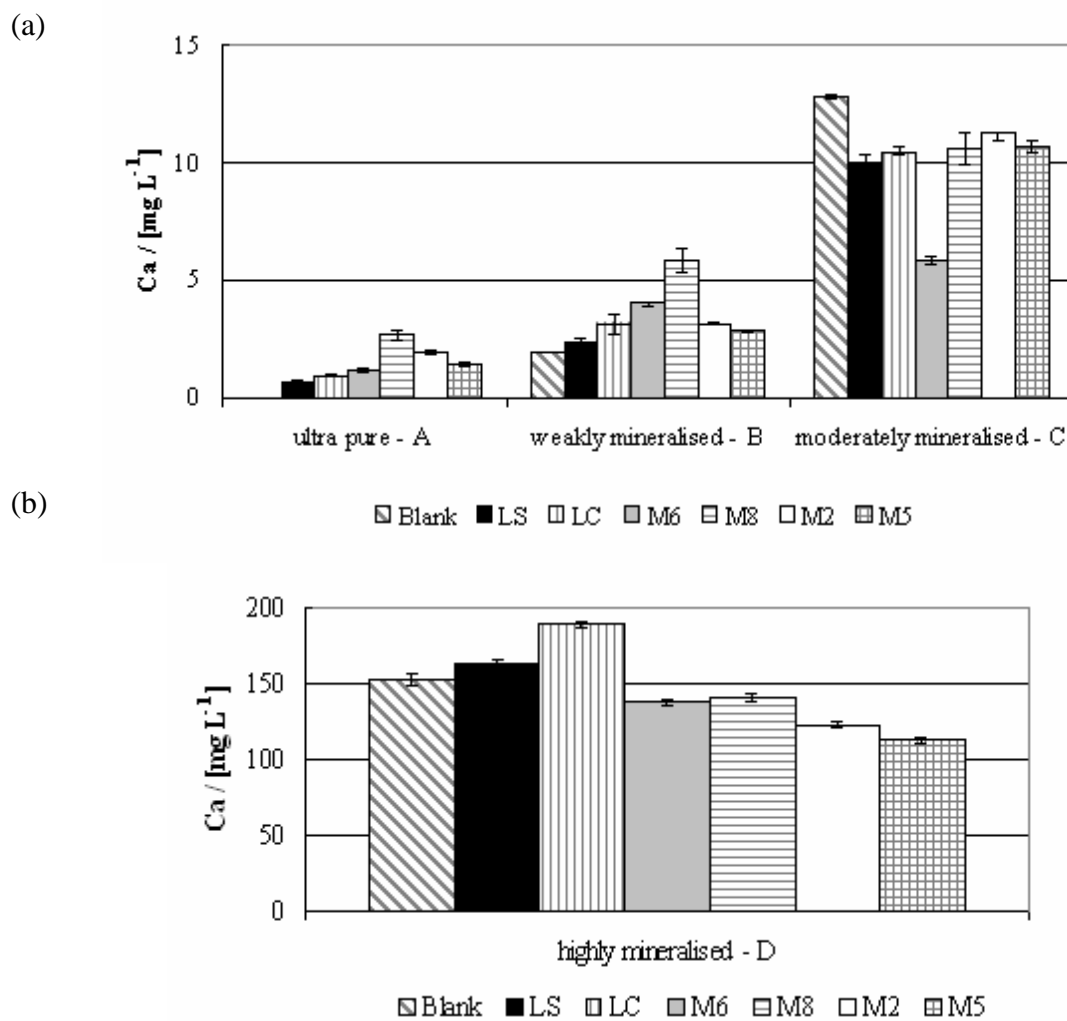


Fig. 4: Calcium concentrations in digested infusions with waters: a) ultra pure - A, weakly mineralised - B, moderately mineralised - C and b) highly mineralised - D

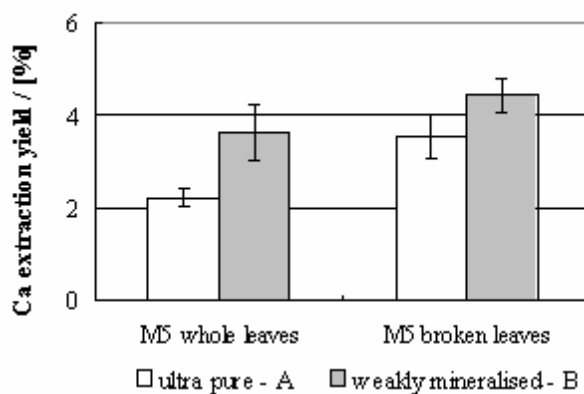


Fig. 5: Calcium extraction yields with whole and broken M5 tea leaves

Table 1 : Composition of waters

Waters	pH	Anions (mg L ⁻¹)						Cations (mg L ⁻¹)				Ionic strength ⁽⁴⁾ (mmol L ⁻¹)
		Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	F ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺		
A	N.H. ⁽¹⁾	5.7 – 6.5	n.d. ⁽³⁾	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	H. ⁽²⁾	5.7 – 6.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
B	N.H.	6.1	2.4 ± 0.1	4.9 ± 0.1	n.d.	2.19 ± 0.03	2.16 ± 0.02	1.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	2.8 ± 0.5	0.9 ± 0.1	0.30 ± 0.03
	H.	7.1	2.9 ± 0.1	2.3 ± 0.1	n.d.	2.72 ± 0.03	2.70 ± 0.02	1.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	2.2 ± 0.5	0.6 ± 0.1	0.30 ± 0.03
C	N.H.	6.7	14.4 ± 0.2	78 ± 1	0.18 ± 0.01	6.3 ± 0.2	8.0 ± 0.2	13.2 ± 0.2	8.6 ± 0.2	18.8 ± 0.5	7.1 ± 0.1	2.93 ± 0.06
	H.	8.1	15.5 ± 0.1	66 ± 0.3	0.15 ± 0.01	7.5 ± 0.5	8.7 ± 0.4	14.4 ± 0.1	9.5 ± 0.2	18.8 ± 0.5	7.5 ± 0.1	3.01 ± 0.05
D	N.H.	7.2	10.3 ± 0.1	281 ± 4	0.20 ± 0.08	5.3 ± 0.4	338 ± 1	200 ± 1	45 ± 1	7.7 ± 0.5	2.5 ± 0.1	23.4 ± 0.2
	H.	8.0	11.0 ± 0.2	156 ± 1	0.14 ± 0.08	5.5 ± 0.4	359 ± 3	151 ± 8	47 ± 1	7.7 ± 0.5	2.5 ± 0.1	20.5 ± 0.6
E	N.H.	7.4	11.6 ± 0.1	330 ± 2	0.07 ± 0.05	8.7 ± 0.2	17.8 ± 0.5	92 ± 1	12.6 ± 0.5	4.1 ± 0.5	0.8 ± 0.1	9.1 ± 0.1
	H.	8.5	12.6 ± 0.1	213 ± 1	0.16 ± 0.05	9.3 ± 0.2	19.5 ± 0.5	64 ± 3	13.2 ± 0.5	4.3 ± 0.5	0.9 ± 0.1	6.8 ± 0.2
<div>(1) N.H.: not heated water (2) H.: heated water (3) n.d. not detected (4) estimated from major ion analyses</div>												

Table 2: Water/leaf ratios for preparing infusions

Teas	water/leaf ratio (m:m, %)
Lipton Yellow (LS) ⁽¹⁾	0.6
Lipton Lemon (LC) ⁽¹⁾	
Darjeeling Oaks (M6)	1.7
Namring (M8)	2
Green teas (M2, M5)	2.5

(1) after removing bag

Table 3: Influence of water and of tea used on pH of tea infusion

#	Waters		Black Teas				Green Teas	
	Blank	Heated blank	LS	LC	M6	M8	M2	M5
A		5.7 – 6.5	4.6	4.2	5.4	5.4	5.6	5.7
B	6.1	7.1	5.3	4.6	5.8	5.4	5.8	6.0
C	6.7	8.1	6.8	5.8	6.5	6.1	6.3	6.3
D	7.2	8.0	7.3	7.2	7.2	7.8	7.1	7.3
E	7.4	8.5	7.3	7.3	7.4	7.5	6.9	7.4

Table 4: Particle sizes of tea leaves measured by image analysis

	µm	LS	LC	M6	M8	M2	M5	M5B
Length	Average size	805	1431	4647	5251	6966	5146	496
	Median	639	1410	4522	4794	7200	4124	372
	Skewness	1.7	0.5	0.5	0.52	0.3	1.2	2.2
Width	Average size	469	814	1666	2056	2006	1770	187
	Median	402	832	1649	1931	2041	1550	99
	Skewness	0.3	1.0	0.8	0.6	0.4	1.1	2.5

Table 5: Total aluminium and calcium contents (mg g⁻¹) of tea leaves

	Tea	Al	Ca	Reference
Black tea	LS	0.73 ± 0.02	3.8 ± 0.6	This study
	LC	1.0 ± 0.1	5.03 ± 0.04	This study
	M6	0.40 ± 0.02	3.65 ± 0.01	This study
	M8	0.93 ± 0.05	4.9 ± 0.4	This study
	Black tea	0.90 ± 0.01	4.5 ± 0.2	Odegard and Lund (1997)
	Black tea	0.81 ± 0.06	4.55 ± 0.07	Matsuura <i>et al.</i> (2001)
Green tea	M2	0.44 ± 0.002	3.29 ± 0.07	This study
	M5	0.54 ± 0.001	4.20 ± 0.04	This study

Table 6: Effect of water composition on total aluminium concentrations in infusions of black or green teas

Water	Aluminium (mg L ⁻¹) ⁽¹⁾					
	Black Teas				Green Teas	
	LS	LC	M6	M8	M2	M5
A	1.8 ± 0.2	1.83 ± 0.05	0.95 ± 0.05	2.47 ± 0.05	0.74 ± 0.06	3.24 ± 0.05
B	1.4 ± 0.1	1.42 ± 0.07	0.94 ± 0.04	2.45 ± 0.05	0.72 ± 0.02	2.80 ± 0.02
C	1.7 ± 0.2	1.84 ± 0.05	0.27 ± 0.05	1.79 ± 0.06	1.26 ± 0.07	1.50 ± 0.2
D	1.0 ± 0.1	1.92 ± 0.05	0.06 ± 0.05	1.51 ± 0.05	0.18 ± 0.06	0.89 ± 0.07

(1) Differences in the confident interval are due to variability of digestion

Table 7: Influence of water composition on mass balance of calcium in leaves and water before and after brewing of M8 tea

Calcium amount (mg)		Waters			
		A	B	C	D
Before brewing	in leaves	19 ± 1	19 ± 1	19 ± 1	19 ± 1
	in water	0	0.32 ± 0.04	2.4 ± 0.4	28.8 ± 0.4
	Total	19 ± 1	19 ± 1	21 ± 1	48 ± 1
After brewing	in leaves	14.0 ± 0.8	19.2 ± 0.8	18.8 ± 0.4	23.2 ± 0.8
	in infusion	0.44 ± 0.04	1.2 ± 0.4	2.0 ± 0.04	26.4 ± 0.8
	Total	14.4 ± 0.8	20 ± 1	20.8 ± 0.4	50 ± 2

Étude de la composition minérale et organique des liqueurs de thé et de leurs caractéristiques organoleptiques : Influence des paramètres physico-chimiques de l'eau

L'analyse de la composition organique et minérale d'infusions réalisées avec différentes variétés de thés et différentes eaux a permis de montrer que la physico-chimie de l'eau (composition, pH, température) contrôle l'extraction des composés présents dans les feuilles et les propriétés organoleptiques des liqueurs obtenues. Le calcium, en particulier, présent sous forme libre, diminue l'extraction des éléments minéraux, des polyphénols et de la caféine du fait de sa grande affinité pour les composés pariétaux des feuilles. Sa présence influence l'odeur globale et la couleur des liqueurs de thé. L'amertume et l'astringence, corrélées à la teneur en polyphénols, apparaissent donc comme indirectement liées à celle en calcium. Le contre-ion n'intervient que s'il modifie le pH et donc la couleur des liqueurs en modifiant les propriétés des polyphénols. Ces résultats complétés par des calculs de spéciation ont permis de proposer un mécanisme global d'échange entre les feuilles et l'eau.

Mots-clés : thé, polyphénols, caféine, éléments minéraux, composition chimique de l'eau, calcium, analyse sensorielle, HPLC-UV-MS

Inorganic and organic composition of tea infusions and organoleptic characteristics: Influence of water chemistry

In this work, we showed that physico-chemistry of the water (*i.e.* composition, pH, temperature) used to brew tea leaves plays an important role in the extraction of organic matter and mineral element by using different tea leaves and several waters. Particularly, if water contains dissolved calcium, the extraction of mineral elements, polyphenols and caffeine decreases due to the high affinity of calcium for cell wall compounds. This element also modifies global odour and colour of tea infusions. Bitterness and astringency, linked to polyphenol content, appear to be only indirectly correlated to calcium content. Counter-ion has to be considered only if it modifies pH and so infusion colour by changing polyphenol properties. A global exchange mechanism for inorganic and organic compounds between leaves and water is proposed from both all these results and speciation calculations.

Keywords: tea, polyphenols, caffeine, mineral element, chemical composition of water, calcium, sensory analysis, HPLC-MS-UV